

老化が亢進していることを考えれば、細胞保護的なオートファジー機能が絶対的もしくは相対的に低下して、細胞老化が亢進し、SASPにより線維化に寄与している可能性が推測できる。現在ユビキチン化を含む傷害された蛋白質、または小器官がIPF肺組織において蓄積している可能性を含めさらに検討中である。

(結 論)

喫煙刺激後のオートファジーによる処理機能の絶対的もしくは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もしくは小器官が蓄積し、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。

文 献

- 1) American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: 646–64.
- 2) Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, Rosenblatt RL, Shay JW, Garcia CK. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:7552-7.
- 3) Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, Danoff S, Su SC, Cogan JD, Vulto I, Xie M, Qi X, Tudor RM, Phillips JA 3rd, Lansdorp PM, Loyd JE, Armanios MY. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:13051-6.
- 4) Minagawa S, Araya J, Numata T, Nojiri S, Hara H, Yumino Y, Kawaishi M, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Nakayama K, Kuwano K. Accelerated Epithelial Cell Senescence in IPF and the Inhibitory Role of SIRT6 in TGF- β -induced Senescence of Human Bronchial Epithelial Cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* In press.
- 5) He C KD. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009;43:67-93.
- 6) Baumgartner KB, Samet JM, Stidley CA, Colby TV, Waldron JA. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Jan;155(1):242-8.
- 7) Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Oct 15;174(8):886-93.
- 8) Chen ZH, Kim HP, Sciarba FC, Lee SJ, Feghali-Bostwick C, Stolz DB, Dhir R, Landreneau RJ, Schuchert MJ, Yousem SA, Nakahira K, Pilewski JM, Lee JS, Zhang Y, Ryter SW, Choi AM. Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2008 Oct 2;3(10):e3316.
- 9) Young AR, N. M., Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* 2009.23: 798-803.
- 10) Aoshiba K, N. A. Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2009. 6: 596-601.
- 11) Komatsu M, Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett.* 2010 Apr 2;584(7):1374-8.

末梢気道損傷に対するEGFR-TKIの作用に関する検討

前山 隆茂¹ 原田 知佳¹ 横山 哲也¹ 緒方 彩子¹
濱田 直樹¹ 桑野 和善^{2*} 中西 洋一^{1*}

上皮増殖因子受容体(EGFR)とそのリガンドは傷害上皮の再生や癌の増殖に関与している。非小細胞肺癌治療薬、ゲフィチニブは重篤な間質性肺炎の原因となるが、機序は未だ不明である。近年、肺傷害からの修復には肺局所幹細胞が重要な働きを持つと考えられるようになってきた。幹細胞の異常は正常な修復を阻害し、肺損傷を引き起こすと考えられる。Clara細胞は肺局所幹細胞の一つであるが、COPDや肺線維症、喫煙者ではClara細胞の機能低下が報告されている。そこで我々は、Clara細胞を特異的に傷害するナフタレン誘導気道損傷マウスモデルを用いて、Clara細胞損傷下におけるゲフィチニブの作用を検討した。C57BL/6マウスにナフタレンをday 0に腹腔内投与し、ゲフィチニブをday -1 ~ 13に投与した。day 7, 14の体重、肺組織所見、BALFを比較した。また終末細気管支上皮細胞をlaser capture microdissection法で採取し、その遺伝子発現をmicroarrayで検討した。ナフタレン単独群ではday7には体重減少、BALF中の炎症細胞数と蛋白濃度の増加を認めたが、day14にはいずれも回復していた。一方、ナフタレン+ゲフィチニブ群ではday14においても体重減少、BALF中炎症細胞数と蛋白濃度の増加は持続していた。終末細気管支上皮の遺伝子発現解析ではナフタレン+ゲフィチニブ群ではナフタレン群と比較して有意に発現亢進した遺伝子が17個同定され、これらには好中球遊走や炎症に関する遺伝子が含まれていた。ゲフィチニブは気道上皮細胞での炎症に関する遺伝子発現を変化させることで、急性肺損傷を増悪させる可能性が示唆された。

The effect of gefitinib on naphthalene-induced bronchiolar epithelial cell injury in mice.

Takashige Maeyama¹, Chika Harada¹, Tetuya Yokoyama¹, 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

Epidermal growth factor receptor (EGFR) and its ligands play important roles in the regeneration of damaged epithelium and proliferation of various epithelial tumors. Although the EGFR-tyrosine kinase inhibitor, gefitinib is effective against advanced non-small cell lung cancer with EGFR mutations, some patients treated with this agent develop severe acute interstitial pneumonia. Characteristics of patients who develop interstitial pneumonia include older age, smoking history, and preexisting interstitial pneumonia suggesting a connection between airway injury and alveolar dysfunction. The purpose of this study was to investigate the effects of gefitinib on airway repair after injury. C57BL/6J mice received intraperitoneally naphthalene at day 0. gefitinib was given per os daily at day -1 to 13 after naphthalene administration. Bronchoalveolar lavage fluid and lung tissue were obtained at day 7 and 14. Terminal bronchial epithelial cells from day 14 were retrieved with laser capture microdissection, and gene expression analyzed using microarray. gefitinib treatment following naphthalene prolonged neutrophil sequestration and induced acute lung injury. We found 17 genes with more than a 3-fold increase in bronchiolar epithelial cells from mice treated with gefitinib following naphthalene at day 14 compared with those treated with naphthalene alone. Upregulated genes are known to participate in neutrophil sequestration, acute inflammation and airway remodeling. We conclude that EGFR inhibition in repairing airway epithelial cells modulated significant expression of genes involved in the airway microenvironment, prolonged inflammation, and potentiated acute lung injury in mice.

はじめに

上皮増殖因子受容体(EGFR)とそのリガンドは、傷害上皮の再生や癌の増殖に関与している。非小細胞肺癌治療薬であるゲフィチニブ(EGFR-tyrosine kinase阻害剤)はしばしば重篤な間質性肺炎の原因となる¹⁾が、機序は未だ明らかではない。間質性肺炎の危険因子として年齢、全身状態不良、喫煙歴、間質性肺炎の既往がある²⁾。気道上皮および肺胞上皮細胞の損傷は、COPD、間質性肺炎、急性肺損傷など様々な疾患の初期事象と考えられる。気道損傷と肺胞機能低下は関与していると考えられているが詳細は不明である。肺局所幹細胞の一つClara細胞は終末細気管支に存在しているが、喫煙者や、COPD、IPF患者でその機能が低下しているとの報告がある³⁾。幹細胞の異常が正常な修復を阻害し、肺損傷を引き起こし、肺線維化にもつながると考えられる。Clara細胞損傷下におけるゲフィチニブの影響を検討するため、Clara細胞特異的な損傷を起こすナフタレン誘導末梢気道損傷マウスモデルを用いて実験を行った。

対象と方法

C57BL/6Jマウスにナフタレン(200mg/kg)を腹腔内投与し、ナフタレン誘導気道損傷モデルを作成した。対照群にはナフタレンの代わりにcorn oilを投与した。ゲフィチニブ(200mg/kg)はナフタレン投与前日から13日後までの間に連日経口投与した。体重、肺組織、BALF中炎症細胞数、BALF中蛋白濃度をday 7とday 14に検討した。さらに終末細気管支細胞をlaser capture microdissection法で採取し、その遺伝子発現をマイクロアレイ法で解析した。

結 果

1) 末梢気道損傷下におけるゲフィチニブの影響

Clara細胞損傷下におけるゲフィチニブの作用を

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

明らかにするために、マウスの体重、肺組織所見、BALF中炎症細胞数、蛋白濃度を検討した。ナフタレン単独群では、day 7に体重減少、肺組織への炎症細胞浸潤、BALF中好中球数増加、BALF中蛋白濃度増加を認めるが、day 14には体重は回復、肺組織はほぼ正常、BALF中の好中球数と蛋白濃度は改善しており、いずれの所見も対照群と比べて有意差を認めなかった。ナフタレン+ゲフィチニブ群ではday 14においても体重減少、組織への炎症細胞浸潤、BALF中好中球数増加、BALF中蛋白濃度増加が持続していた。ゲフィチニブ単独群ではday 7とday 14のいずれにおいても急性肺損傷は認められなかった(図1, 2)。

2) 細気管支上皮細胞におけるCC10, PCNAの発現

末梢気道損傷下でのゲフィチニブのClara細胞への作用を明らかにするために、Clara細胞のマーカーとしてCC10を、増殖のマーカーとしてPCNAを使用して免疫染色を行った。ナフタレン単独群とナフタレン+ゲフィチニブ群では細気管支上皮におけるCC10陽性細胞数は減少していたが、両群間に有意差は認められなかった。またナフタレン単独群とナフタレン+ゲフィチニブ群で、細気管支上皮におけるPCNA陽性細胞数は増加していたが、両群間に有意差は認められなかった(図3)。

3) 細気管支細胞の遺伝子発現変動に対するゲフィチニブの作用

ナフタレン損傷のターゲットであるClara細胞に注目し、マイクロアレイにて細気管支上皮細胞の遺伝子発現を検討した。day 14におけるナフタレン+ゲフィチニブ群とナフタレン単独群を比較したところ、ナフタレン+ゲフィチニブ群ではS100A8, S100A6, Stfa3, Mug1等の好中球動員に関与する遺伝子の発現が増加していた。

考 察

今回われわれはナフタレン末梢気道損傷モデルを用いてClara細胞損傷下におけるゲフィチニブの作用を検討した。ゲフィチニブ単独では肺損傷を生じないが、ゲフィチニブをナフタレン気道損傷モデルに投与すると好中球浸潤を主体とした肺損傷が持続

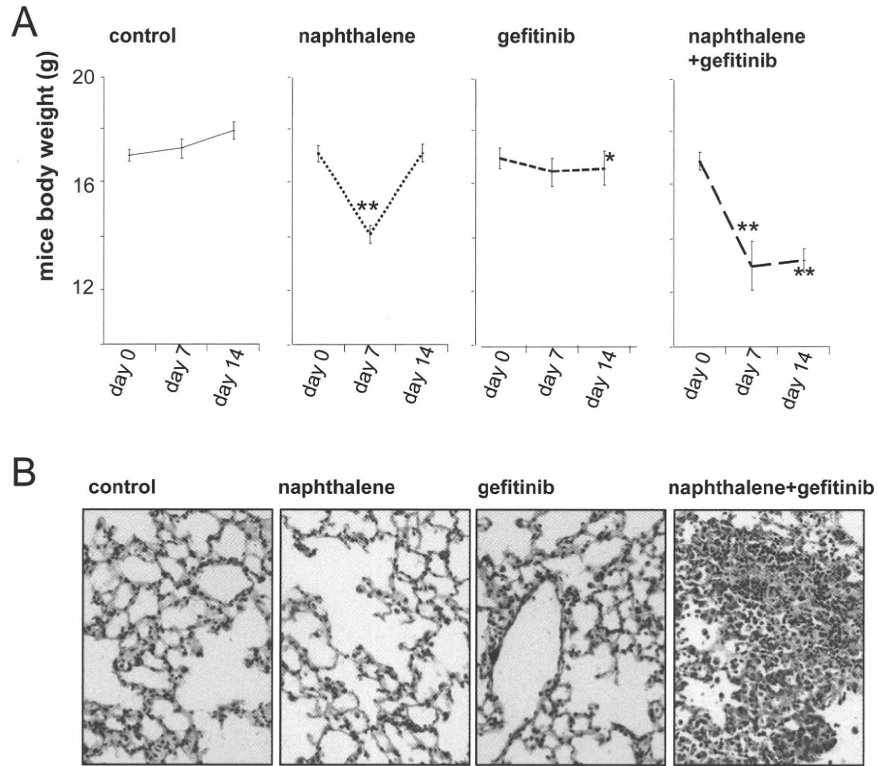


図1 A. マウス体重の推移. グラフは各グループ(それぞれn=5)の平均値±標準誤差を示す. *: P<0.05, **:P<0.01 (同じタイムポイントのcontrol群と比較). B.day14における肺組織所見(HE染色. 倍率×200).

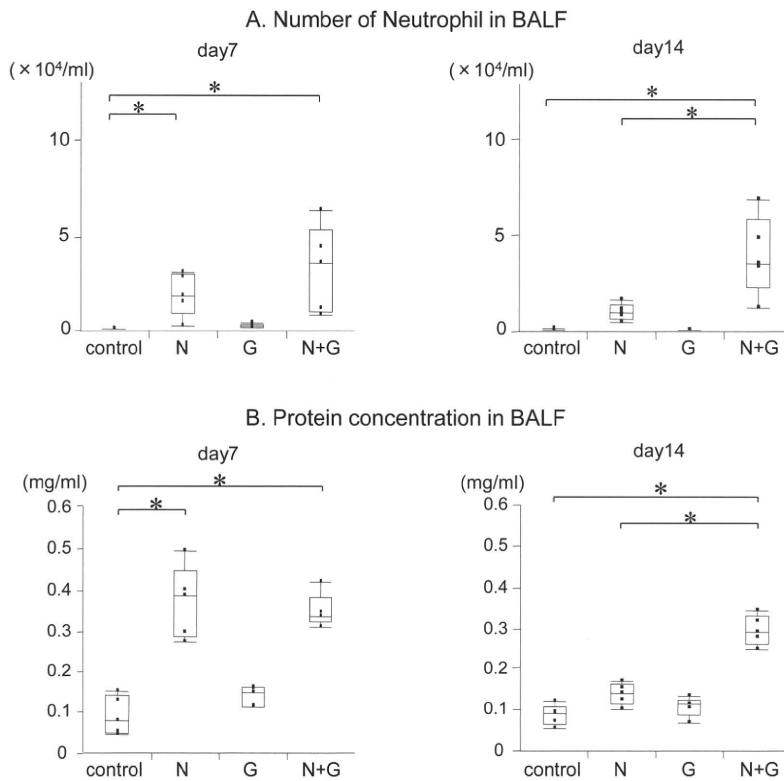


図2 BALF中好中球数(A)とBALF中蛋白濃度(B). *: P<0.01. N: ナフタレン. G: ゲフィチニブ. グラフは箱ひげ図を使用し, 各グループ(それぞれn=5)の平均値±標準誤差を示す.

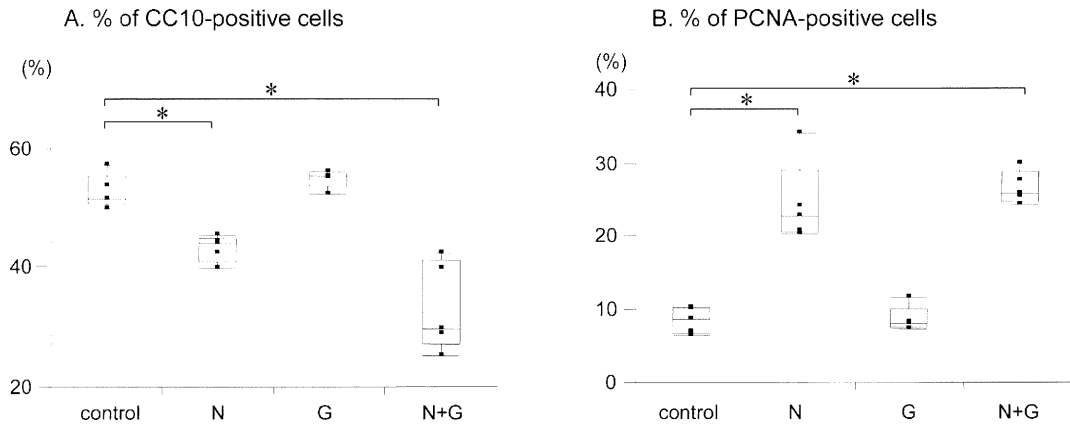


図3 細気管支上皮細胞におけるCC-10, PCNAの発現 (day 14).
各グループ(それぞれn=5)の細気管支(10か所)における陽性細胞数をカウントした.*: P<0.01. N: ナフタレン. G: ゲフィチニブ. グラフは箱ひげ図を使用し, 各グループ(それぞれn=5)の平均値±標準誤差を示す.

することが判明した. ゲフィチニブはClara細胞の再生・増殖を阻害していると仮定されるが, 今回の検討ではナフタレン末梢気道損傷モデルにゲフィチニブを加えてもClara細胞特異蛋白CC10の発現に変化は認めず, またPCNAの発現にも変化はなかった. したがってゲフィチニブはClara細胞の再生も増殖も阻害していないことが考えられた. マイクロアレイの結果からはゲフィチニブは, 傷害から再生するClara細胞において, 炎症に関する遺伝子発現を変化させることで急性肺損傷を増悪させている可能性が示唆された. ゲフィチニブがどのようにして気道上皮細胞での遺伝子発現を変化させているのかは, 今後の検討課題である. ゲフィチニブによる薬剤性間質性肺炎の機序解明につながることを期待される.

参考文献

- 1) Inoue A et al: Severe acute interstitial pneumonia and gefitinib. *Lancet* 2003;361:137-139.
- 2) Kudoh S et al: Interstitial lung disease in Japanese patients with lung cancer: a cohort and nested case-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:1348-1357.
- 3) Gray RD, et al: Sputum proteomics in inflammatory and suppurative respiratory diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:444-452.
- 4) Broeckaert F et al: Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:469-475.

慢性過敏性肺炎の気管支肺胞洗浄液における プロテオミクス解析

岡本 師 宮崎 泰成 白濱龍太郎 稲瀬 直彦*

【目的】過敏性肺炎は種々の原因抗原を吸入することによって引き起こされるアレルギー性肺炎である。慢性過敏性肺炎においてUIPパターンを示す症例は潜在発症型が多いこと、またUIPパターンは急性増悪のリスクとなることが報告されている。そこで慢性過敏性肺炎のUIPパターンの病態に関わる蛋白を明らかにするために気管支肺胞洗浄液(BALF)をfNSIPパターンと比較検討した。【方法】外科的肺生検を行った慢性過敏性肺炎11例(UIPパターン7例、fNSIPパターン4例)のBALFを用いた。2次元電気泳動、SYPRO Ruby染色後、画像解析ソフトを用いて各spotを比較解析した。発現量に差を認めたspotについて質量分析(LC-nESI-MS/MS)およびデータベース検索により蛋白を同定した。【結果】UIP群において有意に発現が高いspotは $\alpha 2$ heat shock protein, surfactant protein A(SP-A)などであり、SP-Aには9個のisoformを認めた。一方fNSIP群において有意に発現が高いspotはvitamin D binding protein, glutathione S-transferase piであった。BALF中のSP-AはELISAでもUIP群において高値を示した。【結論】慢性過敏性肺炎のUIPとfNSIPにおいて発現量の異なる蛋白が明らかにされた。これら蛋白は本疾患あるいは線維化の病態に関わる可能性がある。

Proteome analysis of bronchoalveolar lavage fluid in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis

Tsukasa Okamoto, Yasunari Miyazaki, Ryutaro Shirahama, Naohiko Inase

Department of Integrated Pulmonology, Tokyo Medical and Dental University

Rationale: Hypersensitivity pneumonitis (HP) is an immunologically mediated lung disease induced by inhalation of numerous antigens. The pathological features of chronic HP comprise UIP-like pattern and fNSIP-like pattern. Patients with UIP-like pattern present with insidious onset and have a risk for acute exacerbation.

Objectives: The aim of this study was to investigate proteins related to UIP-like pattern by comparing to fNSIP-like pattern using proteome analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

Methods: BALF samples were obtained from patients with chronic HP who underwent surgical lung biopsies in our hospital between 1998 and 2008. Seven patients with UIP pattern and 4 patients with fNSIP pattern were analyzed. BALF samples were concentrated by acetone precipitation and we analyzed with 2-dimensional electrophoresis. Gels were stained with SYPRO Ruby Protein Gel Stain and scanned with FluoroPhoreStar 3000. Proteins were identified by referring to the SWISS-2D PAGE human plasma map and the published BALF maps, or by liquid chromatography nano electron spray ionization tandem mass spectrometry (LC-nESI-MS/MS). The concentration of pulmonary surfactant protein A (SP-A) in serum and BALF was measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: In comparison of BALF samples between two groups, SP-A and $\alpha 2$ heat shock glycoprotein were significantly higher in the patients with UIP-like pattern than fNSIP-like pattern. In contrast, glutathione S-transferase pi and vitamin D binding protein were significantly higher in the patients with fNSIP-like pattern than UIP-like pattern. We revealed 9 isoforms localized in the SP-A area. The levels of SP-A in BALF from UIP-like pattern were significantly higher than fNSIP-like pattern in the expanded subjects.

Conclusions: We identified several interesting proteins that might have roles in the process of pathological differences between UIP-like and fNSIP-like patterns of chronic HP.

背景

過敏性肺炎は種々の吸入抗原により引き起こされるアレルギー性肺炎である。過敏性肺炎は発症形式により急性と慢性に分けられる。さらに慢性過敏性肺炎は原因抗原の吸入によって急性症状を繰り返し、次第に症状が減弱し肺線維化をきたす再燃症状軽減型と、急性症状がなく労作時呼吸困難と咳嗽だけの症例や健診で発見される潜在性発症型に亜分類される。その病理組織像は特発性間質性肺炎 (IIPs) と同様、unusual interstitial pneumonia (UIP) パターン, fibrotic nonspecific interstitial pneumonia (fNSIP) パターン, cellular nonspecific interstitial pneumonia (cNSIP) パターン, organizing pneumonia (OP) パターンに分類される¹⁾。UIPパターンは潜在性発症型に多く、急性増悪のリスクとなることが報告されている²⁾。

体液のプロテオミクス解析はバイオマーカーの検索に有用な方法である。BALFは肺胞被覆液を正確に反映する体液であり、気管支鏡検査の一つとして日常的に広く行われている。そのBALFを用いたプロテオミクス解析により発現している蛋白の変化や違いから病態に関わる重要な情報が得られる。過去にサルコイドーシス、特発性肺線維症 (IPF)、喘息、慢性閉塞性肺疾患、強皮症肺や過敏性肺炎におけるBALF中のタンパクを解析した報告があるが、組織型別に評価した報告はない。慢性過敏性肺炎の気管支肺胞洗浄液 (BALF) を用いて、UIPパターンとfNSIPパターンについて組織型別に評価することで、病態に関わる蛋白を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

1998年から2008年の間に外科的肺生検を実施し診断された未治療の慢性過敏性肺炎11例 (UIPパターン7例, fNSIPパターン4例) について検討した。

BALF中のタンパク質をアセトン沈殿で濃縮し、2次元電気泳動にて18cm×18cmのゲルに展開した。SYPRO Rubyで染色し、FluoroPhoreStar 3000を用い

東京医科歯科大学 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

表1 患者背景

| | UIP | fNSIP | p value |
|-----------------------------|-------------|-------------|---------|
| Number | 7 | 4 | - |
| Sex (M/F) | 7/0 | 3/1 | - |
| Age (yr) | 58.9±7.5 | 57.5±11.3 | 0.925 |
| Smoking history (pack-year) | 40.7±24.1 | 46.3±36.8 | 0.788 |
| CRP (mg/dl) | 0.22±0.19 | 0.70±0.80 | 0.774 |
| LDH (IU/l) | 265±69 | 262±71 | 0.527 |
| KL-6 (U/ml) | 2249±1147 | 1062±509 | 0.109 |
| SP-D (ng/ml) | 293.3±249.9 | 192.8±171.7 | 0.527 |
| %VC (%) | 85.2±22.8 | 86.8±12.0 | 0.927 |
| %DLco (%) | 57.7±12.5 | 54.8±7.1 | 0.788 |

表2 BALF

| | UIP | fNSIP | p value |
|---|-----------|-----------|---------|
| Number | 7 | 4 | - |
| Recovery rate (%) | 61.2±16.8 | 46.5±12.0 | 0.155 |
| Total cell count (x10 ⁵ /ml) | 3.53±1.99 | 3.37±1.89 | 1 |
| Macrophage (%) | 80.0±10.3 | 68.4±20.3 | 0.412 |
| Neutrophils (%) | 4.2±6.9 | 4.5±4.6 | 0.788 |
| Eosinophils (%) | 0.7±0.5 | 5.2±4.1 | 0.01 |
| Lymphocytes (%) | 15.2±9.1 | 19.4±18.8 | 0.924 |
| CD4/CD8 ratio | 3.4±2.7 | 1.9±0.8 | 0.256 |

て撮影を行った。その画像を解析ソフト Progenesis PG220を用いて各spotを定量化、比較検討した。発現量に差を認めたspotや興味深いspotについてタンパク質同定を行った。同定は質量分析 (LC-nESI-MS/MS) およびSWISS-PROTなどのデータベース検索により行った。

また、血清 (UIP25例, fNSIP17例) およびBALF (UIP15例, fNSIP9例) 中のSP-Aをhuman SP-A ELISA kit (BioVendor-Laboratori medicina a.s., Czech Republic) を用いて定量した。

結果

患者背景において年齢、喫煙歴、血液検査、肺機能検査に差を認めなかった (表1)。BALF所見ではBALF中の好酸球分画がfNSIPパターンにおいてUIPパターンよりも高値を示した (表2)。2次元電気泳動では、分子量10kDa～200kDa, pI4～7の間に約500個のspotを認め、41種類のタンパク質を同定

表3 同定したスポット

| Protein # | Protein | AC | Identification method |
|-----------|--|---------|-----------------------|
| 1 | α -2 macroglobulin | P-01023 | GM |
| 2 | Ceruloplasmin | P-00450 | GM, MS |
| 3 | Immunoglobulin A-S chain | P-99003 | GM, MS |
| 4 | Complement factor B | P-00751 | GM |
| 5 | α -1 B-glycoprotein | P-04217 | GM, MS |
| 6 | Hemopexin | P-02790 | GM, MS |
| 7 | Albumin | P-02768 | GM, MS |
| 8 | Transferrin | P-02787 | GM, MS |
| 9 | Complement C3 β | P-01024 | GM |
| 10 | Immunoglobulin heavy chain α | P-99002 | GM, MS |
| 11 | α -2 antiplasmin | P-08697 | GM, MS |
| 12 | α -1 antichymotrypsin | P-01011 | GM, MS |
| 13 | α -2-HS-glycoprotein | P-02765 | GM, MS |
| 14 | Antithrombin III | P-01008 | GM, MS |
| 15 | Vitamin D-binding protein | P-02774 | GM, MS |
| 16 | α -1 antitrypsin | P-01009 | GM, MS |
| 17 | Zinc finger protein GLIS1 | P-08151 | MS |
| 18 | Apolipoprotein A-IV | P-06727 | GM |
| 19 | β -actin | P-60709 | GM, MS |
| 20 | Fibrinogen γ , α chain | P-02679 | GM |
| 21 | Immunoglobulin heavy chain γ | P-99009 | GM, MS |
| 22 | Immunoglobulin heavy chain γ | P-99006 | GM |
| 23 | Zinc α 2-glycoprotein | P-25311 | GM |
| 24 | Haptoglobin | P-00737 | GM, MS |
| 25 | Toll-like receptor 1 | P-38593 | MS |
| 26 | Orosomucoid 1 | P-02763 | GM |
| 27 | Pulmonary surfactant protein A | P-07714 | GM, MS |
| 28 | Immunoglobulin J chain | P-01591 | GM, MS |
| 29 | Complement factor I | P-05156 | GM |
| 30 | C-reactive protein | P-02741 | GM |
| 31 | Proapolipoprotein AI | P-39133 | GM |
| 32 | Immunoglobulin light chain κ, λ | P-99007 | GM |
| 33 | Apolipoprotein A-1 | P-02647 | GM |
| 34 | Glutathione S-transferase pi | P-09211 | GM, MS |
| 35 | Translationally controlled tumor protein | P-13693 | GM |
| 36 | Serum retinol binding protein | P-02753 | GM |
| 37 | Haptoglobin α | P-00738 | GM |
| 38 | Superoxide dismutase (Cu-Zn) | P-00441 | GM |
| 39 | Transthyretin | P-02766 | GM, MS |
| 40 | Immunoglobulin binding factor | P-15923 | GM |
| 41 | Calgranulin B | P-31725 | GM |

Protein #: reference to the annotations in Figure 1. AC: accession number from the SWISS-PROT database. MS: LC-nESI-MS/MS. GM: Gel matching with two dimensional gel electrophoresis database from SWISS-PROT.

した(表3, 図1・2). UIPパターンとfNSIPパターンで発現量に差を認めたものとして, UIPにより多く発現したタンパク質は, Immunoglobulin heavy chain α , α 2 heat shock glycoprotein, Haptoglobin β ,

Surfactant protein A (SP-A), Immunoglobulin J chainの5種類であり, 一方fNSIPパターンに高発現であったタンパク質は, Vitamin D-binding protein, β -actin, Glutathione S-transferase piの3種類であつ

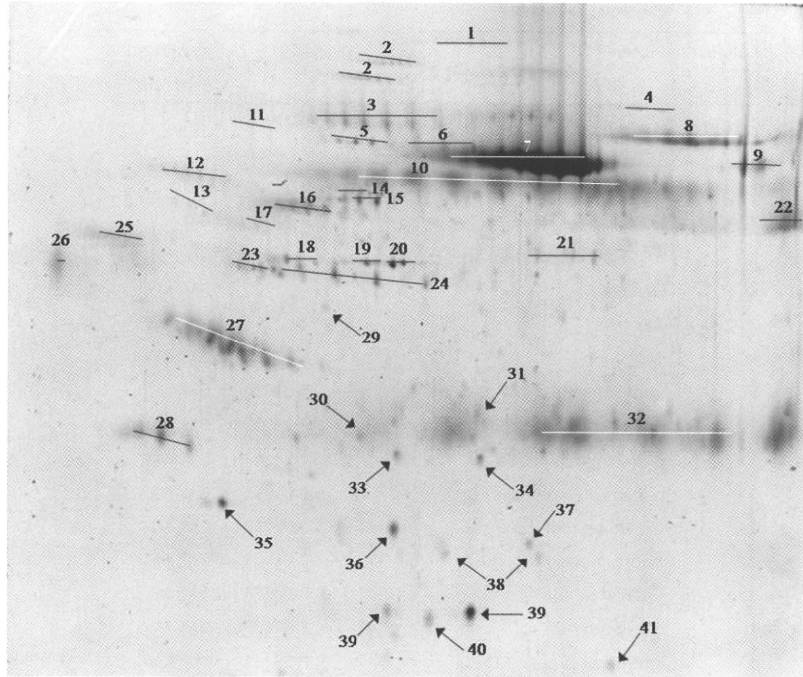
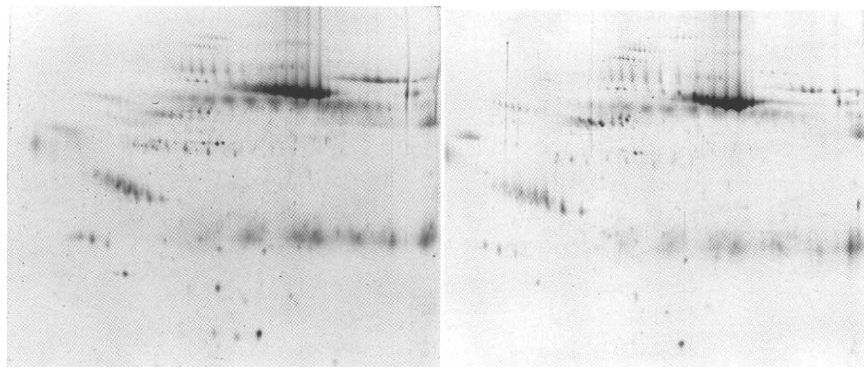


図1 BALFの2次元電気泳動



左；UIPパターン 右；fNSIPパターン

図2 UIPとfNSIPの2次元電気泳動の比較

た(表4). SP-Aについて注目すると, SP-A領域に9つのisoformを認めた(図3). SP-Aの定量では, 血清では2群に差を認めなかったが, BALFではUIPパターンにおいてfNSIPパターンよりも有意に高値を示した(UIP; $2.331 \pm 1.656 \mu\text{g/ml}$, fNSIP; $1.319 \pm 1.916 \mu\text{g/ml}$, $p=0.034$)(図4). 血清中のSP-A値とBALF中のSP-A値に相関関係を認めなかった($p=0.583$).

考 察

Proteomicsの手法を用いて, 間質性肺炎の組織型

別に評価した報告はこれまでにない. 本報告では, UIPパターンとfNSIPパターンで発現量が異なる8つのタンパクを明らかにした. またSP-Aをはじめとして多くのisoformを認めた. これら蛋白発現の差やisoformがUIPとfNSIPの臨床経過や表現型の違いと関連している可能性が示唆された.

BALF所見で, 好酸球分画がUIPパターンにおいて有意に低下していた. 慢性過敏性肺炎における急性増悪群と非急性増悪群の臨床的特徴を比較した報告²⁾では, 非急性増悪群においてBALF中の好酸球分画は高値であり, 急性増悪群においてUIPパターンを多く認めたことから, 好酸球の役割は不明だが

表4 2群間で差異を認めたスポット

| Protein | Normalization volume of UIP ($\times 10^{-3}$) | Normalization volume of fNSIP ($\times 10^{-3}$) | p value |
|-------------------------------------|--|--|---------|
| Immunoglobulin heavy chain α | 946.7 \pm 502.8 | 126.5 \pm 99.1 | 0.024 |
| $\alpha 2$ heat shock glycoprotein | 79.4 \pm 60.1 | 17.8 \pm 14.8 | 0.029 |
| Haptoglobin β | 438.6 \pm 392.4 | 90.5 \pm 97.2 | 0.012 |
| Surfactant protein A | 1153.3 \pm 641.5 | 339.6 \pm 285.5 | 0.024 |
| Immunoglobulin J chain | 243.6 \pm 197.9 | 27.1 \pm 53.9 | 0.029 |
| Vitamin D-binding protein | 146.9 \pm 81.8 | 375.3 \pm 172.0 | 0.029 |
| β -actin | 36.0 \pm 29.5 | 315.0 \pm 194.3 | 0.024 |
| Glutathione S-transferase pi | 65.3 \pm 29.1 | 189.6 \pm 73.1 | 0.012 |

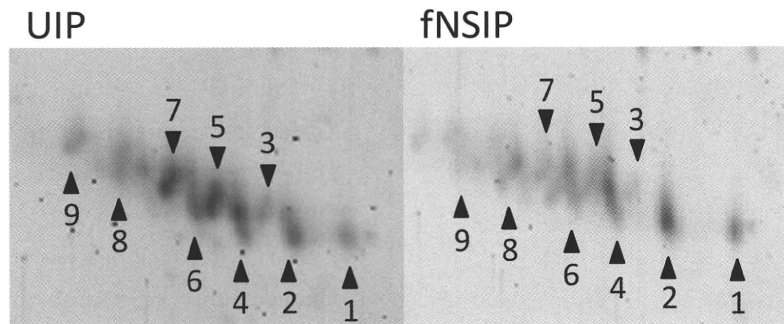


図3 SP-A isoform

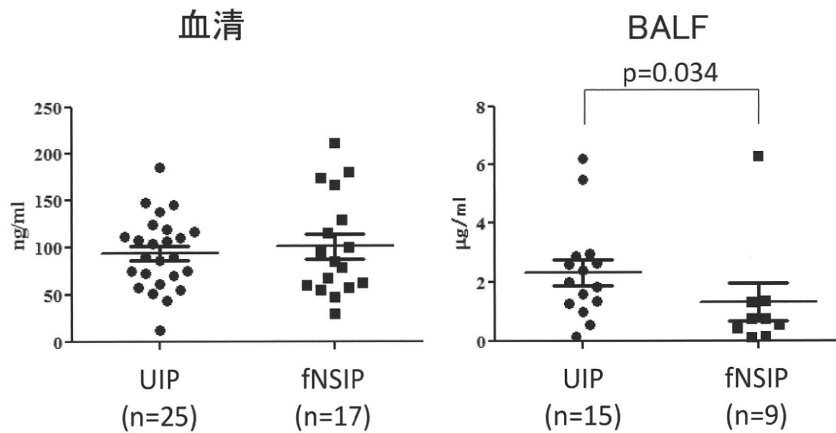


図4 SP-A (ELISA)

類似した結果と言える。

UIPパターンにおいてより多く発現していた蛋白を5つ認めた。 $\alpha 2$ heat shock glycoprotein (Heat shock protein 60)は、様々なストレスで傷害を受けて構造異常をおこした蛋白の修復、および蛋白の合成、運搬、分解に関与する生体防御蛋白である。UIPパター

ンにおけるより強い肺傷害を反映している可能性がある。SP-AはII型肺胞上皮細胞で産生される肺サーファクタントの構成成分であり、肺胞腔内のリン脂質を一定に保ち、気道の感染に対する自然免疫作用がある。特発性肺線維症(IPF)の検討では、増加あるいは低下の両方の報告があり一定の結論は出てい

ない³⁾⁴⁾。

一方、fNSIPパターンにおいてより多く発現した蛋白を3つ認めた。Vitamin D binding proteinは肝臓で主に産生され、免疫、死細胞から誘導される細胞外G-actinの除去、癌抑制などに関与する。細胞外G-actinの除去能の低下はUIPパターンの病態と関連する可能性がある。GST-piは脂質過酸化反応の際に発生し、細胞傷害を起こすヒドロキシアルケナルなどを無毒化する抗酸化作用がある。UIPパターンにおけるGST-piの低下は、酸化ストレスに対する防御反応の低下を反映している可能性がある。

SP-Aについて注目すると、SP-A領域に9つのisoformを認めた。これらは糖化、prolineの水酸化、ジスルフィド結合、シアル酸付加などの様々な翻訳後修飾による変化であると考えられている。肺胞蛋白症⁵⁾やcystic fibrosis⁶⁾においてSP-Aの翻訳後修飾が関与しているという報告もあり、本疾患も翻訳後修飾が病態を反映している可能性がある。

結 論

慢性過敏性肺炎のUIPパターンとfNSIPパターンにおいて、発現量の異なる蛋白が明らかにされた。今後有意差を認めた蛋白に注目して検討し、本疾患あるいは線維化の病態を明らかにする必要がある。

参考文献

- 1) Ohtani Y, Saiki S, Kitaichi M, et al. Chronic bird fancier's lung: Histopathological and clinical correlation. An application of the 2002 ATS/ERS consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Thorax* 2005;60:665-71.
- 2) Miyazaki Y, Tateishi T, Akashi T, et al. Clinical predictors and histologic appearance of acute exacerbations in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2008;134:1265-70.
- 3) Phelps DS, Umstead TM, Mejia M, et al. Increased surfactant protein-A levels in patients with newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2004;125:617-25.
- 4) Schrimdt AG, Yabut-Perez NM, Guth C, et al. Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999;14:565-73.
- 5) He C. Proteomic analysis of human bronchoalveolar lavage fluid: expression profiling of surfactant associated protein A isomers derived from human pulmonary alveolar proteinosis using immunoaffinity detection. *Proteomics* 2003;3:87-94.
- 6) von Bredow C, Birrer P, Griese M. Surfactant protein A and other bronchoalveolar lavage fluid proteins are altered in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2001;17:716-22.

急性肺傷害における急性低酸素状態と遷延化低酸素状態によるサーファクタントプロテインDの発現差異の検討

橋本 直純¹ 阪本 考司¹ 今泉 和良¹
近藤 康博² 谷口 博之^{2*} 長谷川好規^{1*}

急性肺傷害(ALI/ARDS)は肺組織での低酸素状態をきたすが、近年低酸素状態が上皮間葉系移行(EMT)を介した表現型変化を誘導することが報告されてきた。サーファクタントプロテインD(SP-D)は肺上皮細胞から産生されるが、SP-D欠損はさまざまな急性肺傷害・線維化動物モデルにおける致死率の上昇をもたらすことが報告された。ALI/ARDSの発症早期での血清SP-D値の上昇はその予後と相関することが報告されているが、その発症晩期(線維化期)での血清SP-D値と予後の関係は詳細に検討されていない。今回ALI/ARDSの線維化期に血清SP-D値の減少が見られるかどうか、その機序として遷延化低酸素状態が肺上皮細胞でのEMTを介した表現型変化を伴ってSP-D発現調節をきたすかを検討した。ALI/ARDS急性期でのSP-D値はsurvivors群に比較して有意にnonsurvivor群で高値を示したが、線維化期でのnonsurvivors群のSP-D値はsurvivor群のものと変わらなかった。遷延化低酸素状態は肺上皮細胞においてEMTを介した表現型変化を誘導するとともにSP-Dの発現抑制を誘導した。これらから、ALI/ARDSの線維化期における血清SP-D値の低下は遷延化低酸素状態における肺上皮細胞でのSP-D発現抑制を伴ったEMT過程が関与する可能性が示唆された。

Evaluation for surfactant protein D levels in acute and persistent-induced hypoxia in acute lung injury

Naozumi Hashimoto¹, Koji Sakamoto¹, Kazuyoshi Imaizumi¹,
Yasuhiro Kondoh², Hiroyuki Taniguchi², Yoshinori Hasegawa¹

¹Department of Respiratory Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine

²Department of Respiratory Medicine and Allergy, Tosei General Hospital

Since acute lung injury (ALI)/Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is known to give rise to tissue and cellular hypoxia, mounting evidence suggested that persistent hypoxia could induce epithelial-mesenchymal transition (EMT). Although many studies suggested that surfactant protein-D (SP-D) has been shown to play a critical role in immune response, recent studies showed that SP-D deficiency resulted in increasing mortality in acute lung injury model, indicating that SP-D might thwart an overzealous inflammatory response that could potentially damage the lung. Although many studies demonstrated the association of the mortality with increasing SP-D levels at the onset of ALI/ARDS, the association of the circulating SP-D levels in late phase of ALI/ARDS with the prognosis remains uncertain. We retrospectively demonstrated serial evaluation of PaO₂/FiO₂ ratio and circulating SP-D levels in the cases with ALI/ARDS. In late phase, the circulating SP-D levels in nonsurvivors did not differ from those in survivors, irrespectively of coexistence of persistent hypoxia in nonsurvivors, while, in early phase, the circulating SP-D levels in the nonsurvivors were significantly higher than those in the survivors. We demonstrated that persistent hypoxia could repress SP-D expression in epithelial cell lines *in vitro*, with phenotypic changes through EMT. These findings *in vitro* suggested that the decreasing SP-D levels in the late phase of ALI/ARDS might be related to, in part, hypoxia-induced modulation of SP-D expression with EMT in epithelial cells.

はじめに

急性肺傷害 (ALI/ARDS)はさまざまな原因によって引き起こされる臨床的低酸素状態を伴う予後不良の疾患とされている (1)。ALI/ARDSの特徴的な病理所見はdiffuse alveolar damage (DAD)であるが、遷延化低酸素血症を伴うFibrosing alveolitisはしばしばDAD所見を伴う早期滲出期後に合併する (1)。上皮間葉系移行(Epithelial-mesenchymal transition ; EMT)は線維症をはじめとするさまざまな疾患病態において重要な役割を果たすことが広く知られているが、近年低酸素状態がEMTを誘導することが報告された (2)。

surfactant protein-D (SP-D)は肺胞上皮細胞から産生されるが、ALI/ARDSの発症早期の血中SP-D値は疾患の重症度およびその予後と相関することが広く知られている一方 (3)、SP-D欠損は実験肺傷害モデルに対する感受性をもたらし著明な線維化を誘導することが報告された (4)。

我々は、ALI/ARDS線維化期の血中SP-D値の評価を行い、遷延化低酸素状態でのEMTを介した表現型変化とSP-D発現に対する影響を検討した。

方 法

1) 陶生病院でALI/ARDSとして診断された91症例に対する臨床経過中のPaO₂/FiO₂ ratioと血清SP-D値の測定を行った。2) ブレオマイシン(BLM)誘導肺傷害モデルを作成して、全肺SP-Dレベルの評価と肺線維化病変における組織低酸素を評価した。3) 上皮細胞株を低酸素状態で培養して、SP-D発現とEMTを示す表現型を評価した。

結 果

1) ALI/ARDS症例におけるPaO₂/FiO₂ ratioと血清SP-D値の経時的変化

PaO₂/FiO₂ ratioは、臨床経過中survivors群が改善を認める一方、nonsurvivors群は悪化を辿った。血

中SP-Dレベルは、ARDS早期滲出期においてsurvivors群と比較してnonsurvivors群で優位な上昇を認めたが、ARDS14日以降の後期線維化期において、nonsurvivor群での血中SP-DレベルはARDS早期滲出期をピークとしてsurvivors群と同レベルまで低下を認めた。

2) BLM誘導肺傷害モデル

BLM誘導肺傷害モデルを作成して、肺線維化期であるBLM投与後day28での肺組織における組織低酸素化状態を評価した。低酸素化を検出するpimonidazole染色で、コントロール肺と比較してBLM誘導肺線維化病変においてpimonidazole強染色所見を認め肺線維化病変に組織低酸素状態が存在することが確認された。全肺SP-D発現は、BLM投与後day7でコントロール投与と比較して優位な上昇を認めたが、線維化期day28ではコントロール群と同レベルまでの低下を認めた。

3) 低酸素状態の上皮細胞における影響の検討

急性低酸素状態および遷延化低酸素状態によるSPD発現およびEMT誘導の影響を検討するために、上皮細胞株を1%O₂濃度で24時間および72時間培養した。72時間1%O₂濃度培養で、EMTの表現型変化を示すE-cadherinの優位な発現抑制とvimentinの優位な発現亢進を認めた。SP-D発現は24時間での優位な上昇を認める一方、72時間培養での優位な発現抑制を認めた。

考案・結論

骨髄由来線維芽細胞の関与とともに線維化病変における線維芽細胞の多様性について検討する中で (5)、我々は血管内皮細胞特異的LacZ発現マウスに対して*in vivo* BLM誘導肺線維症モデルを作成して血管内皮細胞由来線維芽細胞の同定を行い報告した (6)。これらの検討の中で、線維化病変の形成にEMTを介した線維芽細胞への形質転換が重要な一因になっているという知見を得た。近年、低酸素状態がEMTを誘導する重要な因子であるという報告がなされてきた (2)。ALI/ARDSの発症早期の血中SP-D値は疾患の重症度およびその予後と相関することが広く知られている一方 (3)、SP-D欠損は実験

¹ 名古屋大学大学院医学系研究科呼吸器内科

² 公立陶生病院呼吸器・アレルギー科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

肺傷害モデルに対する感受性をもたらし著明な線維化を誘導することに着目をして(4), 我々はALI/ARDS症例の臨床経過中の血中SP-Dレベルの推移の検討を行った。その中でALI/ARDS肺線維化期に認める遷延化低酸素状態と血中SP-D低下が関連する可能性を得た。この知見に基づいて, BLM誘導肺傷害モデルを作成して肺線維化期における肺線維病変での遷延化低酸素状態の存在を明らかにした。また, BLM誘導肺傷害モデルにおいて急性肺傷害期においてSP-D発現の上昇を認めたが, 肺線維化を伴う慢性肺傷害期でのSP-D発現がコントロール投与群と同じレベルに低下していることを確認した。これらの実験モデルの知見は, ALI/ARDS症例の検討でのSP-Dレベルの時間経過と一致しており, 遷延化低酸素状態がSP-D発現に影響している可能性を示唆した。急性低酸素状態および遷延化低酸素状態によるSP-D発現およびEMT誘導の影響に関する検討においても, 遷延化低酸素状態がEMT誘導とSP-D発現抑制に寄与することを明らかにした。今後の検討にゆだねられるが, SP-D欠損が実験肺傷害モデルにおいて著明な線維化を誘導するという知見と合わせて(4), 遷延化低酸素状態におけるSP-D産生の抑制がEMT誘導とともに線維化病変形成に直接的な役割を示す可能性が示唆された。このことは, 血清SP-Dレベルの上昇が単に肺胞上皮障害による肺胞バリアの透過性亢進の結果を反映することとどまるだけでなく, 低酸素状態による肺傷害に対する上皮細胞のSP-D産生が肺保護作用を反映している可能性も示唆された。

早期の活性化RasとTGF β の両方のシグナル制御がEndothelial-MTを介した線維芽細胞の供給制御に重要であるという我々の知見と合わせて(5), 早期低酸素状態の改善が, 上皮細胞におけるEMT誘導とSP-D発現抑制の制御に重要であると考えられた。

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

まとめ

遷延化低酸素状態は実験的肺傷害モデルにおける

肺線維化病変で認められた。また, 急性期低酸素状態でのSP-D発現亢進は遷延化低酸素状態を伴う肺線維化期において発現低下を示した。これらは, *in vitro*低酸素状態による検討においてもEMTの誘導とともに遷延化低酸素状態におけるSP-D発現抑制が認められた。これらの基礎的検討は, ALI/ARDS症例の臨床的検討の結果とも合致した。これらの知見は, 早期の低酸素状態改善の重要性と新たな治療戦略が必要であることを示唆した。

参考文献

- 1) Ware, L.B., and Matthay, M.A. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342:1334-1349.
- 2) Higgins, D.F., Kimura, K., Bernhardt, W.M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R.S., Kretzler, M., Cohen, C.D., et al. 2007. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117:3810-3820.
- 3) Greene, K.E., Wright, J.R., Steinberg, K.P., Ruzinski, J.T., Caldwell, E., Wong, W.B., Hull, W., Whitsett, J.A., Akino, T., Kuroki, Y., et al. 1999. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1843-1850.
- 4) Casey, J., Kaplan, J., Atochina-Vasserman, E.N., Gow, A.J., Kadire, H., Tomer, Y., Fisher, J.H., Hawgood, S., Savani, R.C., and Beers, M.F. 2005. Alveolar surfactant protein D content modulates bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 172:869-877.
- 5) Hashimoto, N., Jin, H., Liu, T., Chensue, S.W., and Phan, S.H. 2004. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 113:243-252.
- 6) Hashimoto, N., Phan, S.H., Imaizumi, K., Matsuo, M., Nakashima, H., Kawabe, T., Shimokata, K., and Hasegawa, Y. 2010. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43:161-172.

間質性肺炎におけるIV型コラーゲン α 鎖(1-6)の局在と産生

漆山 博和 寺崎 泰弘 康 徳東 雨森 俊介
寺崎 美佳 高橋美紀子 功刀しのぶ 福田 悠*

間質性肺炎は組織型によらず早期線維化巣にI, III型コラーゲンが広く沈着する。我々は、基底膜の主な構成成分であるIV型コラーゲンは、予後不良である通常型間質性肺炎(UIP)やびまん性肺胞傷害(DAD)の早期線維化巣には顕著に沈着するが、予後良好な非特異性間質性肺炎(NSIP)には沈着が軽度であることを見いだし、IV型コラーゲンの沈着の程度と間質性肺炎の予後との関連を報告してきた。

IV型コラーゲンのポリペプチド鎖には6種類の α 鎖($\alpha 1-6$)が存在し、 $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$, $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$, $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ の3種類の組合せでIV型コラーゲンは構成されている。今回は、IV型コラーゲン α 鎖6種の局在と産生について、DADの剖検症例を解析した。また、*in vitro*で培養ヒト肺線維芽細胞を筋線維芽細胞化した際の各 α 鎖の産生を検討した。剖検DAD 18例の組織免疫染色ではDADの早期線維化巣とその筋線維芽細胞周囲に、IV型コラーゲン $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 5$ 鎖の陽性所見を認め、 $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 6$ 鎖は認められなかった。培養肺ヒト線維芽細胞をTGF- $\beta 1$ にて筋線維芽細胞化すると、ウェスタンブロット法ではIV型コラーゲン $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 5$ 鎖のみ分泌量が明らかに増加した。Real-Time RT-PCR法にても、検索したIV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖のmRNA発現量は増加し、 $\alpha 6$ 鎖では増加しないことが確認された。以上の結果より、DADの早期線維化巣のIV型コラーゲン沈着、特に $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 5$ 鎖の沈着は筋線維芽細胞化に伴う病態であり、難治性線維化との関連が示唆された。

The localization and production of α chains of type IV collagen in interstitial pneumonia

Hirokazu Urushiyama, Yasuhiro Terasaki, Dedong Kang, Syunsuke Amenomori,
Mika Terasaki, Mikiko Takahashi, Shinobu Kunugi, and Yuh Fukuda

Department of Analytic Human Pathology, Nippon Medical School

Type I and type III collagen are produced in young fibrotic foci of various histological types of interstitial lung diseases. We reported previously that type IV collagen was deposited in young fibrotic foci of intractable interstitial lung diseases, such as usual interstitial pneumonia and diffuse alveolar damage(DAD), however, the deposition of type IV collagen was subtle in young fibrotic foci of nonspecific interstitial pneumonia. Therefore, type IV collagen depositions in young fibrotic foci may be involved in the refractory pathological finding of interstitial lung diseases. Type IV collagen is composed of six different isoforms, $\alpha 1$ (IV) through $\alpha 6$ (IV) chains. These chains form three distinct assemblies: $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$, $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$, and $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$. These assemblies are distributed differently in the tissues. To investigate the role of type IV collagen deposition in young fibrotic foci of interstitial lung diseases, we analyzed the localization and production of type IV collagen, using autopsy cases with DAD and cultured human lung fibroblasts. Eighteen lungs of autopsy cases with DAD were used for immunohistochemical analysis for the localization of myofibroblasts and α chains of type IV collagen. Human lung fibroblasts, TIG-1-20, were cultured with Transforming Growth Factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and the amounts of secreted α chains of type IV collagen were measured by Western blotting. The mRNA expression of type IV collagen in those stimulated cultured cell was quantified by Real-Time RT-PCR. The Immunohistochemical analysis showed that $\alpha 1$ (IV), $\alpha 2$ (IV) and $\alpha 5$ (IV), but not $\alpha 3$ (IV), $\alpha 4$ (IV) and $\alpha 6$ (IV) chains, were clearly observed in the young intraluminal fibrotic lesions of DAD. In the medium with cultured TIG-1-20 cells stimulated by TGF- $\beta 1$, the amounts of α -SMA, $\alpha 1$ (IV), $\alpha 2$ (IV) and $\alpha 5$ (IV) chains were clearly increased in TGF- $\beta 1$ dose-dependent manner by Western blotting analysis. The upregulation of mRNA expression for COL4A1, but not COL4A6, was observed in TGF- $\beta 1$ dose-dependent manner by Real-time RT-PCR analysis. $\alpha 1$ (IV), $\alpha 2$ (IV) and $\alpha 5$ (IV) depositions with myofibroblasts in the young fibrotic lesions may be involved in the refractory fibrotic process of interstitial lung diseases.

はじめに：

間質性肺炎は組織型によらず早期線維化巣にI, III型コラーゲンが広く沈着する。我々は、基底膜の主な構成成分であるIV型コラーゲンは、予後不良である通常型間質性肺炎(UIP)とびまん性肺胞傷害(DAD)の早期線維化巣には顕著に沈着するが、予後良好な非特異性間質性肺炎(NSIP)には沈着が軽度であることを見いだし、IV型コラーゲンの沈着の程度と間質性肺炎の予後との関連を報告してきた。IV型コラーゲンのポリペプチド鎖には6種類の α 鎖が存在し、 $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$, $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$, $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ の3種類の組合せでIV型コラーゲンは構成されている。今回は、IV型コラーゲン α 鎖6種の局在と産生について、DADの剖検症例を解析した。また、*in vitro*で肺線維芽細胞を筋線維芽細胞化した際の各 α 鎖の産生について検討した。

対象と方法：

1) 対象は増殖期DADの剖検18例(男性12例, 女性6例, 年齢61~87歳)の肺組織標本で、 α 平滑筋アクチン, IV型コラーゲン, IV型コラーゲン α 鎖(1-6)に対する各抗体を用い、免疫染色にて筋線維芽細胞の同定とIV型コラーゲン α 鎖6種の各分布を検討した。
2) *in vitro*での検討のため、培養ヒト肺線維芽細胞

(TIG 1-20)にTGF- $\beta 1$ を添加し、3日後に培養液・細胞溶解液を回収し、筋線維芽細胞化した際の各 α 鎖産生を、ウエスタンブロット法にて検討した。

3) TGF- $\beta 1$ 添加3日後の培養ヒト肺線維芽細胞(TIG 1-20)の、IV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖mRNA(COL4A1)と $\alpha 6$ 鎖mRNA(COL4A6)の発現量を、Real-Time RT-PCR法にて測定した。

結 果：

1) DADの腔内線維化巣に見られる筋線維芽細胞周囲の膠原線維は、全例でIV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖, $\alpha 2$ 鎖が陽性であった(図1)。一方、IV型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖, $\alpha 4$ 鎖, $\alpha 6$ 鎖は全例陰性であった。IV型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖は、部分的に陽性を示す程度であった。

2) 表1に示すように、培養ヒト肺線維芽細胞では、筋線維芽細胞化すると、TGF- $\beta 1$ 濃度依存性にIV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖, $\alpha 2$ 鎖, $\alpha 5$ 鎖の分泌量が明らかに増大したが、 $\alpha 3$ 鎖, $\alpha 4$ 鎖, $\alpha 6$ 鎖では $\alpha 1$ 鎖, $\alpha 2$ 鎖, $\alpha 5$ 鎖と比べて蛋白量が少なく、増大は明らかではなかった。

3) 表2に示すように、TGF- $\beta 1$ により筋線維芽細胞化した培養ヒト肺線維芽細胞は、IV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖mRNA(COL4A1)の発現量が有意に増加したが、 $\alpha 6$ 鎖mRNA(COL4A6)の発現量は有意に低下し、増加は見られなかった。

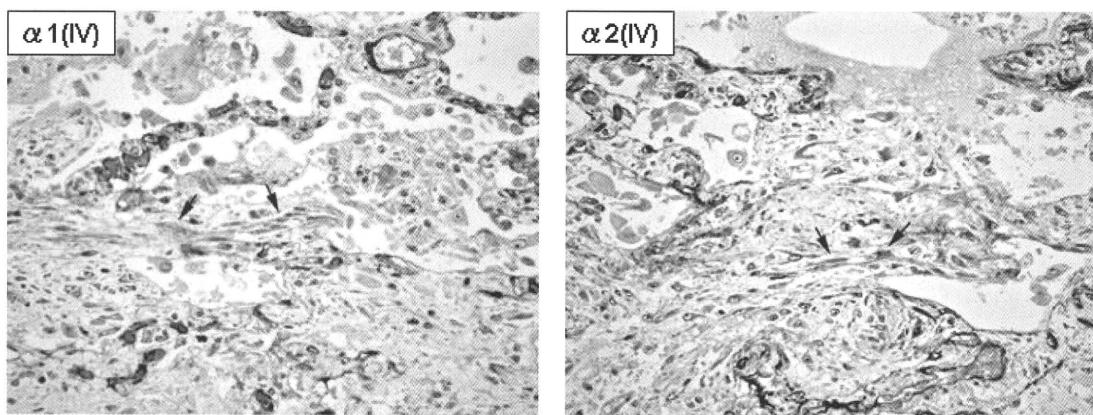
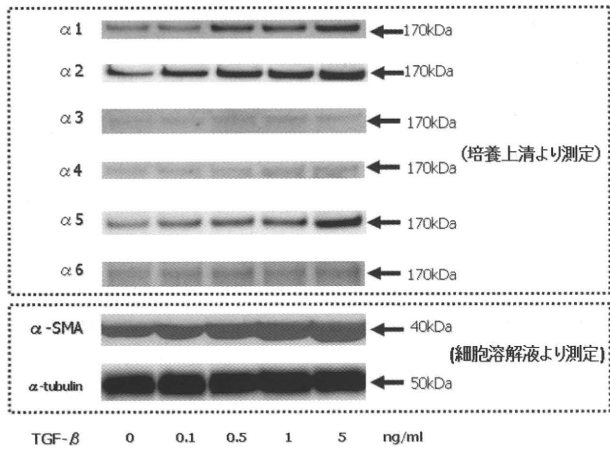


図1 DADの肺腔内早期線維化巣の線維芽細胞
早期線維化巣へのIV型コラーゲンの沈着は $\alpha 1$ 鎖, $\alpha 2$ 鎖が主体である。矢印はIV型コラーゲン α 鎖が線維芽細胞周囲に沈着していることを示す。

表1 ヒト肺線維芽細胞をTGF-β1にて刺激した際、分泌されたIV型コラーゲンをα鎖ごとにウェスタンブロット法にて解析した。α1鎖, α2鎖, α5鎖はTGF-β濃度依存性に培養液中への分泌が増加し, α-SMAもTGF-β濃度依存性に発現が増加した。



考 察：

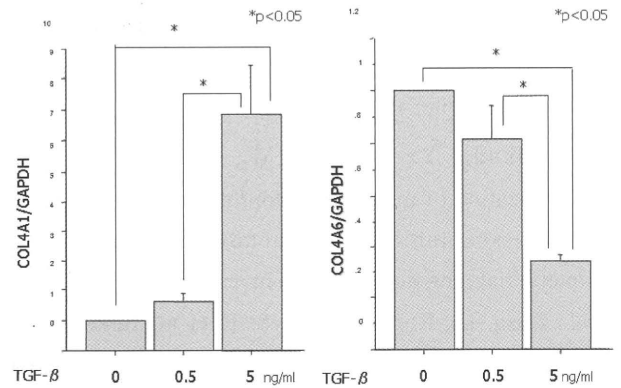
間質性肺炎は、肺胞の間質をおもな場とする炎症性肺疾患であるが、その形態像や予後は間質性肺炎のパターンごとに異なっている。これらの間質性肺炎は共通して、早期線維化巣はおもに肺腔内に形成され、腔内線維化巣の性質の違いが診断的に、また肺既存構造の改築に重要であると考えられている。間質性肺炎のパターンごとの腔内線維化巣の病理学的特徴の違いは、少しずつ明らかになりつつある。治りがたい間質性肺炎の早期肺腔内線維化巣では、形成する間葉系細胞が筋線維芽細胞化しており²⁾、MMP/TIMPではTIMPが優位であり³⁾、治りやすい器質化肺炎などの早期肺腔内線維化巣では、MMP/TIMPではMMPが優位³⁾で、毛細血管新生が見られること^{3),4)}などを我々は報告している。

今回のDADの剖検18例の組織標本の検討では、難治性肺線維化の病態をとるDADの腔内線維化巣を形成する間葉系細胞は、筋線維芽細胞化しており、IV型コラーゲンの形成・沈着が亢進していることが観察された。また、沈着するIV型コラーゲンのα鎖のサブタイプは1型, 2型, 5型が優勢であった。

さらに、培養ヒト肺線維芽細胞を代表的な線維化促進因子であるTGF-β1にて刺激すると、筋線維芽細胞化し、IV型コラーゲンのα1鎖, α2鎖, α5鎖の分泌の増加が認められ、DAD組織の早期腔内線維化巣と同様の病態が*in vitro*でも認められた。

さらに、肺線維芽細胞が筋線維芽細胞化した際の、

表2 ヒト肺線維芽細胞をTGF-β1にて刺激した際のIV型コラーゲンα1鎖mRNA(COL4A1)とα6鎖mRNA(COL4A6)の発現量をreal-time RT PCR法にて解析した。TGF-β添加にてCOL4A1の発現量は増加したが、COL4A6の発現量は低下した。



IV型コラーゲンのサブタイプα鎖のmRNA発現レベルでの解析でも、IV型コラーゲンα1鎖のmRNA(COL4A1)は、添加TGF-β濃度依存性にその発現量が増加したが、IV型コラーゲンα6鎖のmRNA(COL4A6)は、発現量の増加を認めなかった。

IV型コラーゲンは、基底膜のおもな構成成分として広く生体内に分布しているが、近年、I, III型コラーゲンに比して肺線維芽細胞に対する強い走化性を有する⁵⁾ことや、α1鎖, α2鎖のC末端側NC1ドメイン断片が血管新生抑制作用を有する^{6),7)}といったことが、報告されるようになった。また肝臓や腎臓では、血中あるいは尿中のIV型コラーゲン測定が、線維化のマーカーとして実地臨床でも使用されている。

今回我々が報告した、DADにおける早期線維化巣の筋線維芽細胞化に伴うIV型コラーゲン沈着、特にα1鎖, α2鎖, α5鎖の沈着が、このようなIV型コラーゲンの特殊な作用を介して、難治性肺線維化に関与しているかについてさらに検討を進める必要があると考える。

文 献：

- 1) 福田 悠, 富樫 真由子, 康德東, 高橋 美紀子, 山元 滋樹, 功刀 しのぶ: 間質性肺炎の早期線維化巣に出現する細胞と細胞外基質. 厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業 びまん性肺疾患に関する調査研究班. 平成20年度研究報告書

- 2009; 118
- 2) Kuhn, C., McDonald, J.A. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 138:1257, 1991
 - 3) Fukuda, Y., Ishizaki, M., Kudoh, S. et al.: Localization of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 78:687, 1998
 - 4) Elisa, L., Riitta K., Paavo, P. et al: Intraluminal fibromyxoid lesions in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia are highly capillarized. *Human Pathol* 30:1192, 1999
 - 5) Yamauchi, E., Shoji, S., Nishima, S. et al: Contribution of lung fibroblast migration in the fibrotic process of airway remodeling in asthma. *Allergol Int* 57:73, 2008
 - 6) Colorado, P.C., Torre, A., Kalluri, R. et al: Department Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res* 60:2520, 2000
 - 7) Kamphaus, G.D., Colorado, P.C., Kalluri, R. et al: Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem* 275:1209, 2000

肺線維症におけるスフィンゴシン-1-リン酸シグナルの検討

西岡 安彦* 東 桃代 木下 勝弘 岸 昌美 竹崎 彰夫 曾根 三郎

スフィンゴシン1リン酸(sphingosine 1-phosphate:S1P)はGタンパク質共役型S1P受容体ファミリー(S1PR1-S1PR5)を介して下流にシグナルを伝達する脂質メディエーターの一つであり、近年TGF- β の重要なco-factorとして線維化に関与することが注目されている。今回我々は新規免疫抑制剤であるS1P受容体(S1PR)アゴニストであるFTY720が肺線維化を増悪するという研究成果を得たことより肺線維症におけるS1Pの役割について検討を行った。その結果、マウスブレオマイシン(BLM)肺線維症モデルの気管支肺胞洗浄液中にはS1Pが上昇しており、*in vitro*でS1Pは肺線維芽細胞に対し遊走、増殖刺激作用を示した。また肺組織を用いたS1P受容体発現の検討ではBLM+FTY720投与群で強いS1PR1の発現亢進を認めた。以上から、S1P-S1PR1シグナルが肺線維症に関与しており、その機能を制御・調節することで肺線維症の病態解明や治療に応用される可能性が示唆された。

A role of sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling in pulmonary fibrosis

Yasuhiko Nishioka, Momoyo Azuma, Katsuhiko Kinoshita, Masami Kishi, Akio Takezaki and Saburo Sone

Department of Respiratory Medicine and Rheumatology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Japan

S1P is biologically active lipid that has an important role in regulating the growth, survival and migration of various cell types. S1P binds to five G protein-coupled receptors, S1PR1 to S1PR5. Bioactive S1P has been shown to mimic TGF-beta signals; however, the function of S1P in lung fibrotic process has not been well documented. We found that treatment with S1P receptor agonist, FTY720 strongly exacerbated bleomycin (BLM) -induced pulmonary fibrosis in mice. To clarify the mechanism, we investigated the role of S1P signaling in pulmonary fibrosis. The level of S1P increased in bronchoalveolar lavage fluid of BLM-treated mice. The S1P stimulated the proliferation and migration of lung fibroblasts in a dose-dependent manner. The Real-time PCR analysis demonstrated that the expression of S1P1 receptor was strongly up-regulated in BLM-treated lung. The elevated expression of S1PR1 was observed in the fibrotic lung tissue of BLM-treated mice and patient with idiopathic pulmonary fibrosis. These results suggest that the S1P play a role in the pathogenesis of pulmonary fibrosis through S1PR1 signaling pathway.

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

呼吸器・膠原病内科学分野

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

はじめに

特発性肺線維症(IPF)は、極めて予後不良の難治性疾患であり未だ明らかな生命予後を延長する治療法は確立されておらず、さらなる病態解明と新規抗線維化薬の開発が重要な課題となっている¹⁾。

スフィンゴシン1リン酸(sphingosine 1-phosphate:S1P)はGタンパク質共役型S1P受容体(S1PR1-S1PR5)を介して下流にシグナルを伝達する脂質メディエーターの一つで、血管新生や細胞の増殖、分化など様々な作用を発揮する²⁾。近年、S1PはTGF- β の重要なco-factorとして作用し線維芽細胞の分化、遊走を促進し直接線維化に関与する分子として注目されている^{3,4)}。我々は、マウスのブレオマイシン(BLM)肺線維症モデルにおいて新規免疫抑制剤であるS1P受容体アゴニストであるFTY720が肺線維化を増悪するという研究成果を得た。このことからS1Pの機能を制御・調節することで肺線維症の病態解明や治療へ応用することが期待されると考え、肺線維症においてS1Pが果たす役割について検討を行った。

研究方法

In vitroの実験系には、C57BL/6マウス肺由来の線維芽細胞株を使用した。S1Pの肺線維芽細胞の増殖に及ぼす影響は、³H-TdR取り込み試験にて検討した。線維芽細胞の遊走能に与える影響は、Boyden chamber 法にて検討した。7週齢C57BL/6マウスにBLM125mg/kgをmini-osmotic pumpにて持続皮下投与し、マウス肺線維症モデルを作成した。FTY720は1mg/kg/dayをDay14-28に腹腔内投与した。またRT-PCRを用いC57BL/6マウス肺線維芽細胞株、及びBLM誘発線維化肺組織のS1P受容体(S1PR1-S1PR5)の発現を検討した。S1P濃度はマウス肺胞洗浄液(BALF)を用いELISA法にて検討を行った。また肺線維症モデルおよびIPFでのS1P受容体発現を免疫染色法にて検討した。

研究結果

マウスBLM肺線維症モデルにおいてFTY720を後期(BLM投与後14日目から28日目)に投与した結果、肺線維症の増悪を認めた(図1A)。肺線維化を

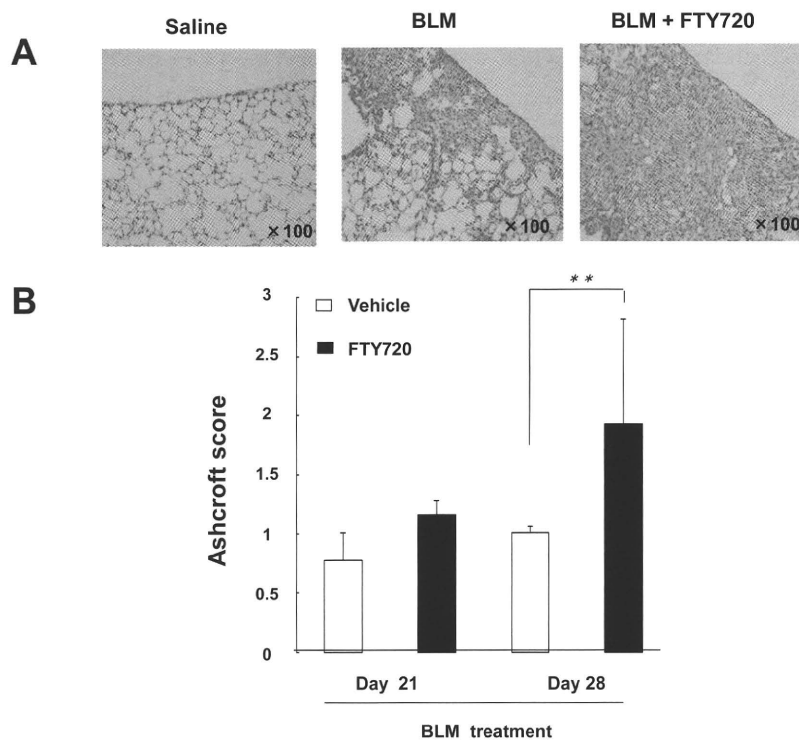


図1 BLM肺線維症モデルにおけるFTY720投与の肺線維化増強効果
ブレオマイシン(BLM)肺線維症モデルマウスにFTY720 1mg/kg/dayを後半投与(14日目-28日目)した。肺組織のHE染色では、BLM肺線維症モデルに比べFTY720投与において強い線維化増強効果を認めた(A)。組織学的検討によりAshcroft scoreを算出した結果、28日目の線維化スコアは有意に上昇していた(B)。** $p < 0.01$