

図6. 抗CADM-140抗体, 抗aminoacyl-tRNA synthetase (ARS)抗体, 臨床的な筋炎を伴わない皮膚筋炎 (clinically amyopathic dermatomyositis, C-ADM), 臨床所見およびHRCT画像所見の関係。

亜型とHRCTパターンの関係は図6に示したとおりである。同定と命名の経緯にもかかわらず、抗CADM-140抗体陽性群の半数はC-ADMの診断基準を満たさなかった。このような抗CADM-140抗体とC-ADMの臨床診断の乖離はGonoらによっても示唆されている[7]。全身症状が強いこと、血清筋逸脱酵素の上昇が軽度であること、血清フェリチン高値は抗CADM-140抗体陽性例の特徴ではあるが、軽度の筋炎はあってもよい。生命予後の違いと特徴的なHRCTパターンに鑑みると、C-ADMの臨床診断よりもむしろ抗CADM-140抗体の有無による亜型分類の方がより有用かもしれない。

抗CADM-140抗体陽性群の高い致死率は、コルチコステロイドと免疫抑制剤(おもにシクロスポリンAおよびシクロフォスファミド)を併用する原稿の治療を超える新たな治療の必要性を示唆している。他方、抗CADM-140抗体陽性例の約半数(41.7%)が現行の治療で生存していた。最近の研究では、抗CADM-140抗体陽性の皮膚筋炎関連間質性肺疾患において、血清フェリチン値の予後予測因子としての意義が報告されているが、症例数が比較的限られた研究であった[7]。従って、CADM-140抗体陽性の皮膚筋炎関連間質性肺疾患における予後因子は、HRCT画像所見も含めて、より大きな患者群で明らかにする必要がある。加えて、皮膚筋炎関連間質性肺疾患全体の中で、抗CADM-140抗体とHRCTパターンの生命予後への影響を比較する必要がある。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に単一施設での小規模研究である。第二にHRCT画像の経時的な変化が評価されていない。これは治療開始後のHRCT撮影が症例によってまちまちな時期にされて

いるため、治療によるHRCT画像所見の変化とその予後因子としての意義は、前向き研究で検討する必要がある。第三に画像所見と病理所見の照合 (radiopathological correlation)がなされていない。しかし、皮膚筋炎関連間質性肺疾患もしくは膠原病関連間質性肺疾患における病理診断や外科的肺生検の意義は明らかにされていない[21, 22]。さらに、ときに外科的肺生検は特発性肺線維症や他の間質性肺疾患において急性増悪を誘発する恐れがある[23-25]。

これらの限界はあるものの、我々は抗CADM-140抗体陽性の皮膚筋炎関連間質性肺疾患が予後不良であり、下肺優位の浸潤影・スリガラス影パターンとランダムなスリガラス影パターンがその画像的な特徴であることを示した。これらのパターンは、皮膚筋炎関連間質性肺炎全体の中で、下肺優位の網状影パターンと比べて、予後不良であった。抗CADM-140抗体の有無とHRCT画像所見は、皮膚筋炎関連間質性肺炎の予後予測において、ともに有用である。

### 参考文献

- 1) Douglas WW, Tazelaar HD, Hartman TE, Hartman RP, Decker PA, Schroeder DR, Ryu JH. Polymyositis-dermatomyositis-associated interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(7): 1182-1185.
- 2) Fathi M, Lundberg IE. Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17(6): 701-706.
- 3) Won Huh J, Soon Kim D, Keun Lee C, Yoo B, Bum Seo J, Kitaichi M, Colby TV. Two distinct clinical types of interstitial lung disease associated with polymyositis-dermatomyositis. *Respir Med* 2007; 101(8): 1761-1769.
- 4) Gunawardena H, Betteridge ZE, McHugh NJ. Myositis-specific autoantibodies: their clinical and pathogenic significance in disease expression. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48(6): 607-612.
- 5) Sato S, Hirakata M, Kuwana M, Suwa A, Inada S, Mimori T, Nishikawa T, Oddis CV, Ikeda Y. Autoantibodies to a 140-kd polypeptide, CADM-140, in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2005; 52(5): 1571-

- 1576.
- 6) Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, Kawabata D, Ohmura K, Usui T, Fujii T, Okawa K, Mimori T. The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49(3): 433-440.
  - 7) Gono T, Kawaguchi Y, Satoh T, Kuwana M, Katsumata Y, Takagi K, Masuda I, Tochimoto A, Baba S, Okamoto Y, Ota Y, Yamanaka H. Clinical manifestation and prognostic factor in anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody-associated interstitial lung disease as a complication of dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 2010.
  - 8) Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975; 292(7): 344-347.
  - 9) Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26(2): 319-338.
  - 10) The Committee of Pulmonary Physiology JRS. Guidelines for Pulmonary Function Tests: Spirometry, Flow-Volume Curve, Diffusion Capacity of the Lung. The Japanese Respiratory Society, Tokyo, 2004.
  - 11) Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, McLoud TC, Muller NL, Remy J. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology* 2008; 246(3): 697-722.
  - 12) Sumikawa H, Johkoh T, Colby TV, Ichikado K, Suga M, Taniguchi H, Kondoh Y, Ogura T, Arakawa H, Fujimoto K, Inoue A, Mihara N, Honda O, Tomiyama N, Nakamura H, Muller NL. Computed tomography findings in pathological usual interstitial pneumonia: relationship to survival. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(4): 433-439.
  - 13) Johkoh T, Muller NL, Colby TV, Ichikado K, Taniguchi H, Kondoh Y, Fujimoto K, Kinoshita M, Arakawa H, Yamada H, Suga M, Ando M, Koyama M, Nakamura H. Nonspecific interstitial pneumonia: correlation between thin-section CT findings and pathologic subgroups in 55 patients. *Radiology* 2002; 225(1): 199-204.
  - 14) Lynch DA, Travis WD, Muller NL, Galvin JR, Hansell DM, Grenier PA, King TE, Jr. Idiopathic interstitial pneumonias: CT features. *Radiology* 2005; 236(1): 10-21.
  - 15) Travis WD, Hunninghake G, King TE, Jr., Lynch DA, Colby TV, Galvin JR, Brown KK, Chung MP, Cordier JF, du Bois RM, Flaherty KR, Franks TJ, Hansell DM, Hartman TE, Kazerooni EA, Kim DS, Kitaichi M, Koyama T, Martinez FJ, Nagai S, Midthun DE, Muller NL, Nicholson AG, Raghu G, Selman M, Wells A. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: report of an American Thoracic Society project. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(12): 1338-1347.
  - 16) Arakawa H, Yamada H, Kurihara Y, Nakajima Y, Takeda A, Fukushima Y, Fujioka M. Nonspecific interstitial pneumonia associated with polymyositis and dermatomyositis: serial high-resolution CT findings and functional correlation. *Chest* 2003; 123(4): 1096-1103.
  - 17) Nagai S, Kitaichi M, Itoh H, Nishimura K, Izumi T, Colby TV. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis: comparison with idiopathic pulmonary fibrosis and BOOP. *Eur Respir J* 1998; 12(5): 1010-1019.
  - 18) Ichikado K, Suga M, Muranaka H, Gushima Y, Miyakawa H, Tsubamoto M, Johkoh T, Hirata N, Yoshinaga T, Kinoshita Y, Yamashita Y, Sasaki Y. Prediction of prognosis for acute respiratory distress syndrome with thin-section CT: validation in 44 cases. *Radiology* 2006; 238(1): 321-329.
  - 19) Johkoh T, Muller NL, Taniguchi H, Kondoh Y, Akira M, Ichikado K, Ando M, Honda O, Tomiyama N, Nakamura H. Acute interstitial pneumonia: thin-section CT findings in 36 patients. *Radiology* 1999; 211(3): 859-863.
  - 20) Kang EH, Lee EB, Shin KC, Im CH, Chung DH, Han SK, Song YW. Interstitial lung disease in patients with polymyositis, dermatomyositis and amyopathic dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44(10): 1282-1286.

- 21) Ito I, Nagai S, Kitaichi M, Nicholson AG, Johkoh T, Noma S, Kim DS, Handa T, Izumi T, Mishima M. Pulmonary manifestations of primary Sjogren's syndrome: a clinical, radiologic, and pathologic study. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(6): 632-638.
- 22) American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(2): 277-304.
- 23) Suda T, Kaida Y, Nakamura Y, Enomoto N, Fujisawa T, Imokawa S, Hashizume H, Naito T, Hashimoto D, Takehara Y, Inui N, Nakamura H, Colby TV, Chida K. Acute exacerbation of interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases. *Respir Med* 2009; 103(6): 846-853.
- 24) Kondoh Y, Taniguchi H, Kitaichi M, Yokoi T, Johkoh T, Oishi T, Kimura T, Nishiyama O, Kato K, du Bois RM. Acute exacerbation of interstitial pneumonia following surgical lung biopsy. *Respir Med* 2006; 100(10): 1753-1759.
- 25) Park IN, Kim DS, Shim TS, Lim CM, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim WD, Jang SJ, Colby TV. Acute exacerbation of interstitial pneumonia other than idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2007; 132(1): 214-220.

【平成22年度】

## 特発性肺線維症における急性増悪の危険因子の検討

谷口 博之\* 近藤 康博 木村 智樹 片岡 健介

背景: 特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) の急性増悪はよく知られた病態であるが, その危険因子や, 予後に影響を及ぼすかについては明らかではないため, それらの検討を行った. 方法: 「特発性間質性肺炎診断と治療の手引き」のIPFの診断基準を満たし, 3年以上(死亡以外)の観察期間を有し肺機能の追跡が可能であった症例を対象とした. 急性増悪の危険因子としては, 呼吸困難の指標としてはmodified MRCスコア, 6か月でのFVCの10%以上の悪化, などを含めた種々の予後因子を検討した.

結果: 1年, 2年, 3年の急性増悪の頻度はおのおの8.6%, 12.6%, 23.9%であった. 多変量解析では, body mass index(BMI)高値 [hazard ratio (HR), 1.20; 95% confidence interval (CI), 1.03-1.40], modified MRCスコア高値 [HR, 2.93; 95% CI, 1.46-5.85], 6ヶ月後のFVC10%以上の低下 [HR, 2.60; 95% CI, 0.95-0.99]が急性増悪の独立した危険因子であった. 経過中57例が死亡し, 死因では20例が急性増悪で死亡していた. 急性増悪は, %FVC, 6か月でのFVCの10%以上の悪化で補正後も, 有意な予後因子であった [HR, 2.79; 95% CI, 1.59-4.88;  $p < 0.001$ ].

結語: modified MRCスコア高値, BMI高値, 6ヶ月後のFVC10%以上の悪化は, IPFにおける急性増悪の独立した危険因子であった. 急性増悪はIPFの独立した予後因子であった.

## Risk Factors of Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Hiroyuki Taniguchi, Yasuhiro Kondoh, Tomoki Kimura, Kensuke Kataoka

*Department of Respiratory Medicine and Allergy, Toosei General Hospital*

Background: Although acute exacerbation (AE) of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a well known clinical condition, predicting risk factors remain unknown. We evaluated the frequency, risk factors and impact on survival of AE-IPF.

Methods: We retrospectively studied patients diagnosed with IPF based on the criteria of the ATS/ERS consensus statement and followed them for periods of more than 3 years except in dead cases. Initial characteristics including the level of dyspnoea, which was assessed with the modified Medical Research Council (MRC) scale, and decline of forced vital capacity (FVC) defined by at least 10% decline at 6 months, were evaluated as possible risk factors for AE.

Results: Seventy-four patients with IPF were studied. One-year, two-year, and three-year incidence of AE were 8.6%, 12.6%, and 23.9%, respectively. Multivariate analysis revealed that higher body mass index (BMI) [hazard ratio (HR), 1.20; 95% confidence interval (CI), 1.03-1.40], higher modified MRC scale [HR, 2.93; 95% CI, 1.46-5.85], and at least 10% decline in FVC [HR, 2.60; 95% CI, 0.95-0.99] were independent risk factors for AE-IPF. The causes of death were assessed to be AE in 20 of 57 expired patients. A stepwise multivariate Cox regression model evaluating AE-IPF, adjusted for %FVC and decline in FVC, demonstrated a statistically significant impact on overall survival [HR, 2.79; 95% CI, 1.59-4.88;  $p < 0.001$ ].

Conclusion: These data suggest that initial high modified MRC scale, high BMI, and at least 10% decline in FVC at 6 months were significant independent risk factors for AE-IPF. AE was an independent prognostic factor in IPF.

## 緒 言

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis; 以下 IPF) は通常慢性経過を呈する疾患であるが (1), 時に急性増悪を経験することが報告されている (2,3,4,5,6).

IPF では, 種々の予後因子が報告されている (7-17). 年齢, 性別, 呼吸困難の程度, 喫煙歴, body mass index (BMI) は予後因子とされている. さらに, 肺機能所見, PaO<sub>2</sub>, BAL の好中球比率も予後因子とされている. 一方, 急性増悪の予後は極めて不良と報告されているが, IPF の予後因子と急性増悪の関係について検討した報告はない.

最近の検討では, 6 か月あるいは12 か月での FVC の10% 以上の悪化は重要な予後因子として報告されている (13-16). King らは, FVC の10% 以上の悪化は disease progression の有用な指標と報告している (18). 急性増悪の病態は現時点では解明していないので, disease progression と急性増悪との関連についての検討は重要と思われる.

今回の我々は, IPF の予後因子が急性増悪の危険因子となるかどうかにつき検討した. さらに, 急性増悪の予後に与える影響が種々の予後因子で補正したのちも有意であるかどうかについても検討した.

## 対象と方法

2000 年1月から2005 年12月までの間に陶生病院で IPF と診断された102 人が研究対象となった. IPF の診断は, ATS/ERS の consensus statement の診断基準 (1) に従った.

高分解能 CT で明らかな蜂巣肺所見を認める場合は外科的肺生検がなくとも IPF と診断した. 外科的肺生検にて診断したのは30 例であった (Table 1). 膠原病合併例, 職業および環境暴露例は除外した. 初診時急性増悪症例は除外した.

肺機能検査が, 死亡を除いて3年以上の経過が追えている症例を検討対象とした. 肺機能の経過は3～6 か月毎の間隔で行われた. IPF 110 例のうち, 21 例が肺機能検査が不十分, 15 例が初回評価時に BAL を未施行の理由で除外され, 残った74 例が検

討対象となった. 臨床・検査所見は後方視的に臨床記録から収集された. 本研究は陶生病院の倫理委員会で承認された.

急性増悪の定義は, 日本呼吸器学会の改訂診断基準を用いて診断された (19, 20).

初回評価が行われのち経過観察を行い, 急性増悪の頻度と危険因子の検討が行われた. 初回評価の, 患者背景, modified Medical Research Council (MRC), 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の細胞分画, 6 ヶ月後の FVC の10% 以上の悪化, 等が急性増悪の危険因子として検討された. 治療については, 無治療, ステロイドと免疫抑制剤の併用療法や臨床治験も含め種々の治療が行われており, 治療期間はさまざまに併用療法もされており, 治療法についての検討は行わなかった.

2000 年6月の生存状態が検討され, 死因と急性増悪の生存にあたる意義につき検討された.

## 結 果

初回評価時の患者背景と BALF 所見は Table 1 に示す.

### 急性増悪の診断と, 増悪の原因の除外

2000 年1月から2009 年6月の間に, 23 人が急性増悪と診断された. 23 人のうち, BAL の微生物学的検査は17 名に行われ, 喀痰検査, 血液培養検査は全例で行われ, 細菌, マイコプラズマ, ウイルス, 真菌, あるいは *Pneumocystis jiroveci* の急性増悪への関与は除外された. BALF を施行された17 例において Ziehl-Neelsen 染色, Gomori methenamine 銀染色, 種々のウイルス培養検査 (cytomegalovirus, herpes simplex, varicella zoster virus, measles virus, adenovirus, influenza A, influenza B, parainfluenza 1-3, および respiratory syncytial virus) は陰性であった. 尿中肺炎球菌抗原, レジオネラ抗原は全例で陰性であった. 全例で D-dimer, 心エコー, CT が行われ肺塞栓は否定された.

### 急性増悪の頻度と危険因子

急性増悪を起こした群と起こさなかった群の比較が Table 1 に示す. 喫煙状態は両群間で有意な差を認めしたが, コックスの比例ハザードモデルでは急性

**Table 1.** Clinical, pulmonary function, and bronchoalveolar lavage findings in 74 patients with idiopathic pulmonary fibrosis

	Total	AE	None AE	P Value
Number of cases	74	23	51	-
Sex, male	61	20	41	0.721
Age	64.1±7.4	62.9±8.9	64.6±6.7	0.459
Smoking history, N/Ex/C	20/37/17	7/14/2	13/23/15	0.021
BMI	23.5±3.1	24.7±2.9	22.9±3.0	0.019
modified MRC scale, 2 and above	10/33/28/3/0	13	18	0.145
PaO <sub>2</sub> , mmHg	81.0±11.6	78.7±12.2	82.8±11.0	0.285
FVC, % predicted	77.0±19.2	73.5±20.9	79.1±18.2	0.199
DLco, predicted	59.3±18.7	57.3±21.6	60.2±17.6	0.554
10% decline in FVC at 6 months, yes	13	8	5	0.018
Time to 10% decline in FVC, mo	18.7±19.2	15.2±12.2	20.4±17.4	0.196
Follow-up time, mo	45.6±26.0	30.2±19.7	52.5±25.6	<0.001
SLB yes	30	10	20	0.928
BAL				
Macrophages, %	90.7±12.1	92.3±7.5	89.9±13.7	0.649
Neutrophils, %	2.0±3.5	1.4±1.5	2.2±4.0	0.981
Lymphocytes, %	5.4±6.7	5.0±6.5	5.5±6.8	0.632
Eosinophils, %	1.0±1.8	1.1±2.3	0.9±1.5	0.585
CD4/8	2.36±2.66	2.65±3.53	2.24±2.12	0.876
Albumin, mg/ml	65±34	60±29	65±37	0.611

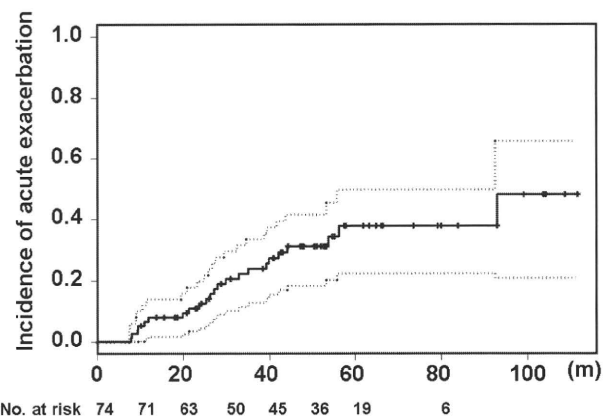
Definition of abbreviations: AE = acute exacerbation; N/Ex/C = non-smoker/ex-smoker/current smoker; BMI = body-mass index; MRC = Medical Research Council; FVC = forced vital capacity; DLco = diffusing capacity for carbon monoxide; BAL = bronchoalveolar lavage; SLB = surgical lung biopsy

増悪の危険因子ではなかった。BMIは急性増悪群で有意に高値であった(24.7 ± 2.9 対 22.9 ± 3.0, p=0.019) (Table 1)。外科的肺生検診断例と臨床診断例で急性増悪の頻度に差は認めなかった(10/30 (33.3%) 対 13/44 (29.5%), p = 0.928)。

6ヶ月後の評価で、13例がFVCで10%以上低下した。急性増悪群と非増悪群で、6か月後のFVC悪化に有意差を認めた(8/23 対 5/51, p=0.018) (Table 1)。

Kaplan-Meier曲線にて1年、2年、3年の急性増悪の頻度はそれぞれ8.6% (95% confidence interval (CI), 1.7-12.6%), 12.6% (95% CI, 4.5-20.0%), and 23.9% (95% CI, 12.9-33.5%)であった (Figure 1)。

コックスの比例ハザード法での単変量解析では、modified MRC scale 高値、FVC低値は有意な急性増悪の予測因子であった (Table 2)。ステップワイズ法による多変量解析ではBMI高値、modified MRC scale 高値、そしてFVCの6か月後での10%以上の悪化が有意な急性増悪の予測因子であった (Table 3)。



**Figure 1.** Incidence of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Dashed lines indicate 95 percent confidence interval.

**予後因子と急性増悪の予後への影響**

経過観察中に23例(31.1%)が急性増悪と診断された。急性増悪例のMST [median survival time] は26.4か月と、非急性増悪例ではMSTは52.8か月と有意に短かった(log rank test, p=0.0002)。MSTは22日で

**Table 2.** Univariate analysis with Cox proportional hazards regression models of predictors of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis

Univariate analysis	Hazard Ratio	95% CI	P Value
Sex, male	1.36	0.40-4.61	0.625
Age	0.98	0.92-1.04	0.459
Smoking history	0.85	0.35-2.09	0.218
BMI	1.14	0.99-1.31	0.067
modified MRC scale, 2 and above	2.95	1.28-6.80	0.011
PaO <sub>2</sub> , mmHg	0.97	0.95-1.01	0.087
FVC, % predicted, per 10%	0.73	0.57-0.93	0.011
DLco, predicted, per 10%	0.85	0.67-1.07	0.168
10% decline in FVC at 6 months, yes	2.25	0.81-6.25	0.120
SLB yes	1.26	0.55-2.88	0.586
<b>BAL</b>			
Macrophages, %	1.02	0.97-1.07	0.553
Neutrophils, %	0.95	0.77-1.16	0.602
Lymphocytes, %	0.99	0.93-1.05	0.736
Eosinophils, %	1.09	0.90-1.33	0.365
CD4/8	1.05	0.90-1.22	0.574
Albumin, mg/ml	0.97	0.85-1.11	0.663

n=74 except for DLco [71] and BALF CD4/8 [73].

Definition of abbreviations: CI = confidence interval; Sex code is 1 for males and 0 for females; Smoking history, code for never-smoker is 0, code for ex-smoker is 1, and code for current-smoker is 2; SLB code is 1 for yes and 0 for no; disease progression = decline of at least 10% in FVC, ; see Table 1

**Table 3.** Stepwise multivariate analysis with Cox proportional hazards regression models of predictors of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis

Stepwise multivariate analysis	Hazard Ratio	95% CI	P Value
modified MRC scale, 2 and above	2.93	1.46-5.85	0.002
BMI	1.20	1.03-1.40	<0.001
10% decline in FVC at 6 months, yes	2.60	1.01-7.45	0.049

n=70, because only patients for whom all data were available were included in the analysis.

あった。

計 57 例 (77.0%) が経過中死亡し、IPF 診断後の MST は 44.4 カ月であった。死因は 20 例 (35.1%) が急性増悪; 23 例 (40.4%) が IPF 進行による慢性呼吸不全; 6 例 (10.5%) で肺癌; 5 例 (8.8%) で肺炎; そして 1 例 (1.8%) で気胸であった。ステップワイズ法による多変量解析では、FVC と 6 ヶ月後の FVC10% 以上の低下の有無で補正しても急性増悪が有意な予後因子であった [hazard ratio (HR) 2.79 (95% confidence interval I(CI) 1.59–4.88); p<0.001; Table 4].

## 考 案

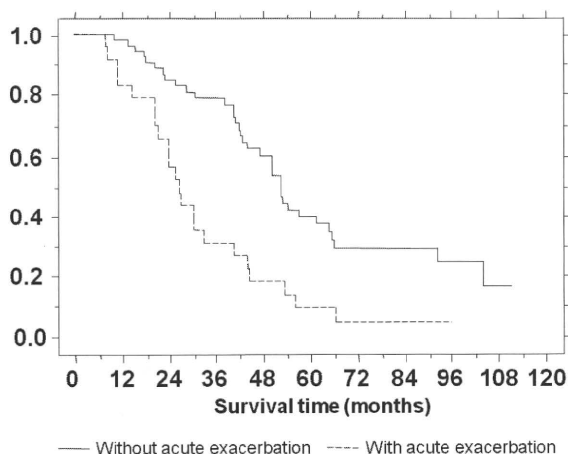
今回の報告は急性増悪の危険因子を検討した最初の検討である。BMI 高値, modified MRC scale 高値, 6 か月後の FVC の 10% 以上の悪化が有意な急性増悪の危険因子であった。また, 急性増悪は多変量解析にて他の予後因子を補正しても有意な予後因子であった。

今回の検討では, 6 か月後の FVC の 10% 以上の悪化が急性増悪の危険因子であった。最近, FVC の低下が有用な予後因子であることが明らかになって

**Table 4.** Univariate and stepwise multivariate analysis with Cox proportional hazards regression models of survival in idiopathic pulmonary fibrosis

Univariate	Hazard Ratio	95% CI	P Value
Sex, male	0.694	0.35-1.36	0.286
Age	1.02	0.98-1.06	0.446
BMI	0.97	0.88-1.07	0.590
modified MRC scale, 2 and above	2.54	1.50-4.32	<0.001
Smoking history	0.89	0.61-1.30	0.555
PaO <sub>2</sub> , mmHg	0.97	0.95-1.00	0.041
FVC, % predicted, per 10%	0.72	0.62-0.85	<0.001
DLco, % predicted	0.83	0.72-0.96	0.014
10% decline in FVC at 6 months, yes	3.68	1.88-7.19	<0.001
SLB, yes	1.40	0.83-2.35	0.250
Acute exacerbation, yes	2.72	1.58-4.69	<0.001
BAL			
Macrophages, %	1.00	0.97-1.02	0.814
Neutrophils, %	1.06	0.97-1.16	0.170
Lymphocytes, %	0.99	0.95-1.03	0.498
Eosinophils, %	1.05	0.93-1.18	0.418
CD4/8	1.03	0.93-1.14	0.564
Albumin, mg/ml	1.00	0.92-1.08	0.999
Stepwise multivariate analysis	Hazard Ratio	95% CI	P Value
Acute exacerbation, yes	2.79	1.59-4.88	<0.001
FVC, % predicted, per 10%	0.49	0.33-0.73	<0.001
10% decline in FVC at 6 months, yes	3.37	1.71-6.63	<0.001

Definition of abbreviations: Acute exacerbation (AE) code is 1 for yes and 0 for no; CI = confidence interval; see Table 1



**Figure 2.** Kaplan-Meier curves for survival for with or without acute exacerbation. There was a significant difference in survival between patients with AE [median survival time (MST), 26.4 months] and those without AE (MST, 52.8 months) (log rank test,  $p=0.0002$ ).

きた(13-16). 急性増悪の病態はいまだ明らかでないが(6), 今回の検討ではFVCの6か月後の低下が急性増悪のリスクを高めることが示された. この結

果からは疾患の活動性と急性増悪の関連が推測され, 更なる検討が必要であろう.

FVCの低値も急性増悪の危険因子であった. Martinezらは, IPFを対象とする臨床研究で, 急性呼吸不全を含む呼吸器症状による入院のリスクはFVC  $\leq 62\%$ の症例で高いと報告している(22). Miyazakiらは, 慢性過敏性肺炎を対象として急性増悪の危険因子を検討したところ診断時のUIP patternと低肺容量が急性増悪の危険因子と報告している(23). したがって, 重症の拘束性障害は急性増悪の危険因子であると推測される.

modified MRC scale高値が急性増悪の危険因子となる理由については不明であるが, COPDを対象とした検討ではmodified MRC scaleは急性増悪と死亡率の危険因子と報告されている(24). IPFにおいて初回評価時の呼吸困難度は, 急性増悪と予後の規定因子となることから, 初回評価時の呼吸困難度の評価は非常に重要である.



IPFにおけるBMIの意義についてはあまり検討されていない。BMI高値は予後良好との報告が1報あるが(9), われわれの検討ではBMI高値は急性増悪の危険因子であった。最近, ARDSのリスクがある重症症例の検討でBMI高値がARDS進展への危険因子であると報告されている(25)。急性増悪とARDSの類似性を考慮すると, この結果はわれわれの結果を支持する結果といえよう。また, 肥満自体が炎症状態を惹起するとも報告されている(9)。そのほか, 胃・食道逆流は, IPFや急性増悪との関連が推測されている(26)。肥満は胃・食道逆流の危険因子となるから(27), 肥満による胃・食道逆流が急性増悪の危険を高めるという可能性が考えられる。BMIと急性増悪との関連については更なる検討が必要である。

今回の検討では, 急性増悪の1年, 2年, 3年での頻度はそれぞれ8.6%, 12.6%, 23.9%であった。Kimらは147例の外科的肺生検診断IPF症例の検討で, 診断2年後の急性増悪の頻度は9.6%であったと報告している(5)。Pirfenidoneのphase II研究では, プラセボ群9カ月間の急性増悪の頻度は14% (35例中5例)であった(28)。IPFにおける抗凝固療法の意義を検討した報告では3年間で56例中32例(57%)が急性増悪にて入院した(29)。最近のPirfenidoneのPhase III研究では, 52週でのplasebo群での急性増悪の発症頻度は4.8%であった(20)。今回のわれわれの検討結果からは, これら報告による頻度の違いは患者背景の違いによると推測される。

今回のIPF症例での死因の検討ではIPF進行による慢性呼吸不全が40.4%と最も多い原因であり, 急性増悪は35.1%と2番目の死因であった。Danielsらの報告では, 呼吸器が原因で死亡したIPF症例の剖検では急性増悪が最も多い死因であった(30)。急性増悪は重要な死因であることから臨床研究においては重要なエンドポイントに含まれるべきであろう。

今回の検討は, 対象症例は日本人のみで, 単一施設での報告である。薬剤性肺傷害の検討から急性増悪は欧米人に比べ日本人に多いのではないかと指摘されている(31)。今回の検討結果が, 日本人以外にも当てはまるかどうか更なる検討が必要である。

## 結 論

今回の検討では, 初回評価時のmodified MRC scale高値, BMI高値, 6ヶ月後のFVCの10%以上の低下が独立した急性増悪の危険因子であった。急性増悪は高頻度に起こり, 有意な予後因子であった。急性増悪のさらなる検討が, 急性増悪のみならずIPF自体の病態理解につながると思われる。

## 参考文献

- 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: 646-664.
- 2) Kondoh Y, Taniguchi H, Kawabata Y, Yokoi T, Suzuki K, Takagi K. Acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis. Analysis of clinical and pathologic findings in three cases. *Chest.* 1993;103:1808-12.
- 3) Akira M, Hamada H, Sakatani M, Kobayashi C, Nishioka M, Yamamoto S. CT findings during phase of accelerated deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *AJR.* 1997;168:79-83.
- 4) Parambil JG, Myers JL, Ryu JH. Histopathologic features and outcome of patients with acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis undergoing surgical lung biopsy. *Chest.* 2005;128:3310-5.
- 5) Kim DS, Park JH, Park BK, Lee JS, Nicholson AG, Colby T. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: frequency and clinical features. *Eur Respir J.* 2006; 27: 143-50.
- 6) Collard HR, Moore BB, Flaherty KR, et al. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176: 636-643.
- 7) Flaherty KR, Toews GB, Travis WD, Colby TV, Kazerooni EA, Gross BH, Jain A, Strawderman RL 3rd, Paine R, Flint A, Lynch JP 3rd, Martinez FJ. Clinical significance of histological classification of idiopathic interstitial pneumonia. *Eur Respir J.* 2002;19:275-83.
- 8) Nadrous HF, Pellikka PA, Krowka MJ, Swanson

- KL, Chaowalit N, Decker PA, Ryu JH. Pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2005;128:2393-9.
- 9) Alakhras M, Decker PA, Nadrous HF, Collazo-Clavell M, Ryu JH. Body mass index and mortality in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2007;131:1448-53.
- 10) King TE Jr, Tooze JA, Schwarz MI, Brown KR, Cherniack RM. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1171-81.
- 11) Schwartz DA, Helmers RA, Galvin JR, et al. Determinants of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149:450-454.
- 12) Nishiyama O, Taniguchi H, Kondoh Y, et al. A simple assessment of dyspnea as a prognostic indicator in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2010 Apr 22. [Epub ahead of print].
- 13) Latsi PI, du Bois RM, Nicholson AG, et al. Fibrotic idiopathic interstitial pneumonia: the prognostic value of longitudinal functional trends. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:531-7.
- 14) Collard HR, King TE Jr, Bartelson BB, Vourlekis JS, Schwarz MI, Brown KK. Changes in clinical and physiologic variables predict survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168: 538-42.
- 15) Flaherty KR, Mumford JA, Murray S, et al. Prognostic implications of physiologic and radiographic changes in idiopathic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:543-8.
- 16) Jegal Y, Kim DS, Shim TS, et al. Physiology is a stronger predictor of survival than pathology in fibrotic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:639-44.
- 17) Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI, Ix JH, Kervitsky A, King TE Jr. Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2008;133:226-232
- 18) King TE Jr, Safrin S, Starko KM, et al. Analyses of efficacy endpoints in a controlled trial of interferon- $\gamma$  1b for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2005; 127:171-177.
- 19) Taniguchi H, Kondoh Y. Revised criteria for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *The Annual Report by Study Group of Ministry of Health and Welfare for Diffuse Lung Disease*. 2004; 114-9.
- 20) Taniguchi H, Ebina M, Kondoh Y, et al. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2010;35: 821-9.
- 21) Selman M, Carrillo G, Estrada A, et al. Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: PLoS ONE 2(5): e482
- 22) Martinez FJ, Safrin S, Weycker D, et al. The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med*. 2005;142(12 Pt 1):963-7.
- 23) Miyazaki Y, Tateishi T, Akashi T, Ohtani Y, Inase N, Yoshizawa Y. Clinical predictors and histologic appearance of acute exacerbations in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest*. 2008;134:1265-1270.
- 24) Ong KC, Earnest A, Lu SJ. A multidimensional grading system (BODE index) as predictor of hospitalization for COPD. *Chest*. 2005;128:3810-6.
- 25) Gong MN, Bajwa EK, Thompson BT, Christiani DC. Body mass index is associated with the development of acute respiratory distress syndrome. *Thorax*. 2010;65:44-50
- 26) Tobin RW, Pope CE 2nd, Pellegrini CA, et al: Increased prevalence of gastroesophageal reflux in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1804-1808.
- 27) El-Serag H. The association between obesity and GERD: a review of the epidemiological evidence. *Dig Dis Sci*. 2008;53:2307-12.
- 28) Azuma A, Nukiwa T, Tsuboi E, et al. Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:1040-7.
- 29) Kubo H, Nakayama K, Yanai M, et al. Anticoagulant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2005;128:1475-82.
- 30) Daniels CE, Yi ES, Ryu JH. Autopsy Findings in

42 consecutive patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2008;32:170-4.

31) Azuma A, Hagiwara A, Kudoh S. Basis of acute

exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis in Japanese patients *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;

177: 1397 – 1398.

## (7) 基礎的檢討

【平成20年度】

## 肺線維症におけるCCN6/WISP3の役割

西岡 安彦\* Batmunkh Rentsenkhand 青野 純典 東 桃代  
木下 勝弘 岸 昌美 曾根 二郎

CCN(CYR61, CTGF, NOV)ファミリーにはこれまで6種類の分子が同定されており、その中でもCTGFはTGF- $\beta$ によって発現誘導される分子として肺線維化における役割が検討されてきた。一方、肺線維化と他のCCNファミリー分子の関係は明らかではない。今回我々はCCN6/WISP3の肺線維化における役割について検討した。その結果、CCN6/WISP3は肺線維芽細胞に対する増殖刺激作用を示した。抗CD29( $\beta$ 1インテグリン)抗体によりCCN6/WISP3による線維芽細胞増殖刺激効果が部分的に阻害された。一方、CCN6/WISP3には肺線維芽細胞に対するcollagen Iおよびfibronectin産生刺激作用を認めなかった。ブレオマイシン(BLM)肺線維症モデルでは、BLM投与後7～14日目にCCN6/WISP3の発現増加がみられた。以上から、CCN6/WISP3は肺線維化早期において、肺線維芽細胞の増殖刺激作用を介して肺線維化に関与している可能性が示唆された。

### Role of CCN6/WISP3 in pulmonary fibrosis

Yasuhiko Nishioka, Batmunkh Rentsenkhand, Yoshinori Aono, Momoyo Azuma,  
Katsuhiro Kinoshita, Masami Kishi, and Saburo Sone

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

The CCN (CYR61, CTGF, NOV) family is a group of six secreted proteins that specifically associate with the extracellular matrix. Among them, CTGF is reported to be induced by TGF- $\beta$ 1, and the role of CTGF in pulmonary fibrosis has been under investigation. Meanwhile, the relationship between other CCN family and pulmonary fibrosis is not fully understood. We investigated the role of CCN6/WISP3 in pulmonary fibrosis. CCN6/WISP3 significantly stimulated the proliferation of mouse lung fibroblasts such as C57BL/6 and Mlg, and that the effects were partially inhibited by the anti-CD29 ( $\beta$ 1 integrin) antibody. On the other hand, production of collagen I and fibronectin was not stimulated by CCN6/WISP3. In the bleomycin lung fibrosis model, the expression of CCN6/WISP3 in the lungs was increased from day 7 to 14 days after instillation of bleomycin. These data suggest that CCN6/WISP3 might have a key role in lung fibrosis through a stimulatory effect on the proliferation of fibroblasts in the early phase of lung fibrosis.

はじめに

特発性肺線維症(IPF)は、原因不明の慢性進行性肺線維化疾患であり、未だ生命予後を延長する治療法は確立されておらず新規治療法の開発が急務となっている<sup>1)</sup>。一方CCN(CYR61, CTGF, NOV)ファミリーは1990年代に発見されたシステインを豊富に含むタンパク質群で、細胞の分裂、接着、アポトーシスなどに深く関与することがこれまで知られている<sup>2)</sup>。CCNファミリーにはCCN1/CYR61, CCN2/CTGF, CCN3/NOV, CCN4/WISP1, CCN5/WISP2, CCN6/WISP3の6つの分子が同定されているが、中でもCCN2/CTGFがIPF患者のII型肺胞上皮細胞、筋線維芽細胞に発現しているという報告<sup>3,4)</sup>や、マウスのブレオマイシン肺線維症モデルにおいてCCN2/CTGFのmRNAが発現しているという報告<sup>5)</sup>から、肺線維化との関連が検討されてきた。CCN2/CTGFは、TGF-βによって発現誘導される分子であり、直接肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化やコラーゲン産生刺激作用を有する<sup>6)</sup>。さらに、肺においてウイルスベクターを用いて強制発現させると、一過性の線維化を生じることも報告されている<sup>7)</sup>。

しかしながら、肺線維化と他のCCNファミリー分子の関係については未だ十分な解明がなされていない。そこで我々はCCN6/WISP3を中心に、肺線維化においてCCNファミリーが果たす役割について検討を行った。

方 法

CCN1～6のレコンビナント蛋白(PeproTech EC Ltd., UK)を使用し、C57BL/6マウスから樹立した肺線維芽細胞株とMlg(マウス正常肺線維芽細胞株-ATCCより購入)を用いて、3H-TdR取り込み試験により細胞増殖を検討した。また、マウスインテグリンに対する抗体(Chemicon Inc., USA)を用いて肺線維芽細胞でのインテグリンの発現をflow cytometryにて評価した。Collagen及びfibronectin産生はreal-time RT-PCRを用いて評価した。FAK[Y397]のリン酸化は、抗FAK抗体(BD Transduction Lab., USA)および抗FAK[pY397]抗体(Invitrogen, USA)を用いたWestern blottingにて評価した。さらに、in vivoにおけるCCN6/WISP3発現を確認するため、マウス肺線維症モデルの肺組織を検討した。肺線維症モデルは

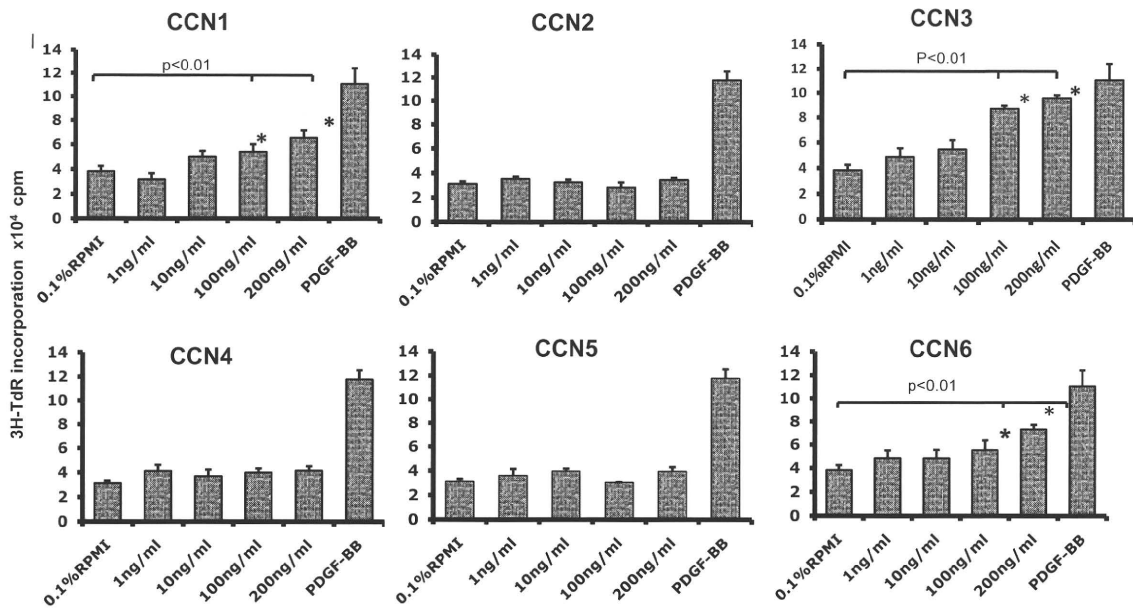


図1 CCNファミリーがマウス肺線維芽細胞株(C57BL/6)の増殖に及ぼす影響  
C57BL/6マウスより作成した肺線維芽細胞株を用いて<sup>3</sup>H-TdR(1μCi/well)を18時間パルスし、増殖能を測定した。CCN1, CCN3, CCN6は濃度依存的にC57BL/6線維芽細胞の増殖を刺激した。

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

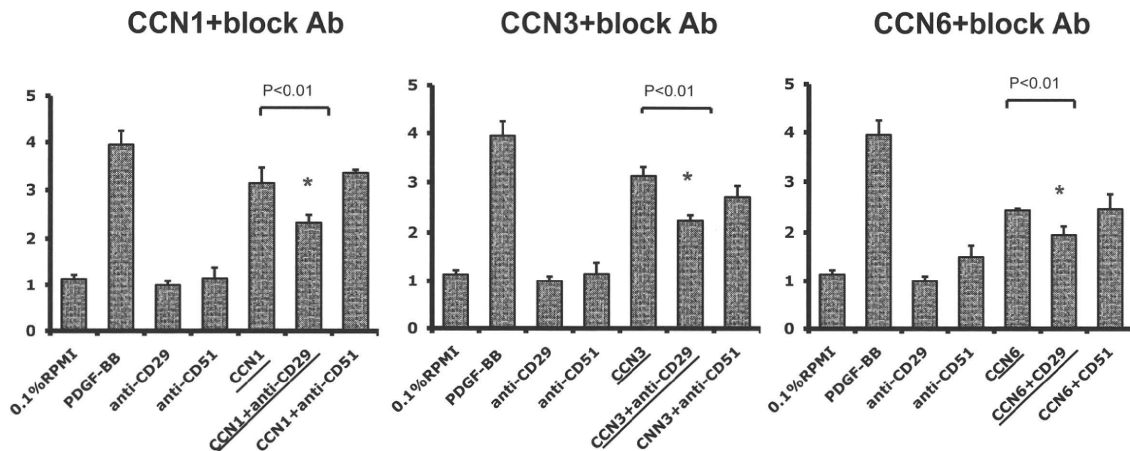


図2 CCN1, CCN3, CCN6によるマウス肺線維芽細胞の増殖刺激効果に及ぼす抗CD29抗体の影響  
C57BL/6マウスより作成した肺線維芽細胞株を用いて、PDGF-BB (10 ng/ml)で72時間刺激後<sup>3</sup>H-TdR(1uCi/well)を18時間パルスし、増殖能を測定した。その結果、抗CD29抗体の添加によりCCN1, CCN3, CCN6の線維芽細胞増殖抑制効果は有意に減弱された。

8週齢のC57/BL6マウスにブレオマイシン(bleomycin: BLM)125mg/kgをAlzet mini-osmotic pumpを用いて約7日間かけて持続皮下投与することにより作成し、肺組織内のCCN6/WISP3発現の経時的な変化をWestern blottingで検討した。

## 結 果

CCN1, CCN3, CCN6は濃度依存的にC57BL/6マウス肺線維芽細胞株の増殖を刺激することが確認された(図1)。一方、CCN2, CCN4, CCN5には肺線維芽細胞増殖刺激作用は認められなかった。次にflow cytometryにてC57BL/6とMlgマウス肺線維芽細胞におけるインテグリン発現を検討したところ、両線維芽細胞において $\beta 1$ ,  $\alpha v$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 5\beta 1$ インテグリンが発現していることを確認した(data not shown)。そこで、インテグリンの阻害抗体を用いてCCN1, CCN3, CCN6による増殖刺激の阻害効果を検討したところ、抗CD29抗体を加えることによりCCN1, CCN3, CCN6によって誘導される肺線維芽細胞の増殖が部分的に阻害されることを3H-TdR取り込み試験で確認した(図2)。従ってCCN1, CCN3, CCN6はインテグリン $\beta 1$ を介して線維芽細胞に作用していることが推測された。さらにインテグリン下流のシグナル伝達経路について検討したところ、CCN6刺激によりFAKのY397のリン酸化が誘導されることが明らかとなった。以上の結果から、CCN1, CCN3, CCN6による増殖刺激は $\beta 1$ インテグリン-FAKの系を介して起こっていると考えら

れた。

続いてCCN6が肺線維芽細胞のcollagen Iやfibronectin産生を増加させるかどうかについてreal-time RT-PCRを用いて検討を行った。陽性コントロールとしてTGF- $\beta 1$ を用いたが、TGF- $\beta 1$ は経時的にcollagen Iとfibronectinの産生を刺激する一方で、CCN6には同様の効果を認めなかった(図3)。

次にマウスBLM肺線維症モデルの肺内におけるCCN6/WISP3の発現について経時的な検討を行ったところ、BLM投与後7~14日目にCCN6/WISP3の発現増加がみられた(図4)。以上からCCN6/WISP3は肺線維化早期において、肺線維芽細胞の増殖刺激作用を介して肺線維化に関与している可能性が示唆された。

## 考 察

今回我々は各種CCNファミリーの肺線維芽細胞への作用を検討した。その結果、in vitroにおいてCCN1, CCN3, CCN6はマウス肺線維芽細胞の増殖を刺激したが、CCN2, CCN4, CCN5には増殖刺激作用が認められなかった。一方、これまでの報告からCCN2は肺線維芽細胞のコラーゲン産生を増強することが報告されているが、今回検討したCCN6においてはこのような作用は認められなかった。以上の結果は、CCN分子によって線維化に及ぼす効果が異なる可能性を示唆している。CCN1, CCN3, CCN6による肺線維芽細胞の増殖は、 $\beta 1$ インテグリンに対する抗体で阻害され、さらにCCN6刺激は

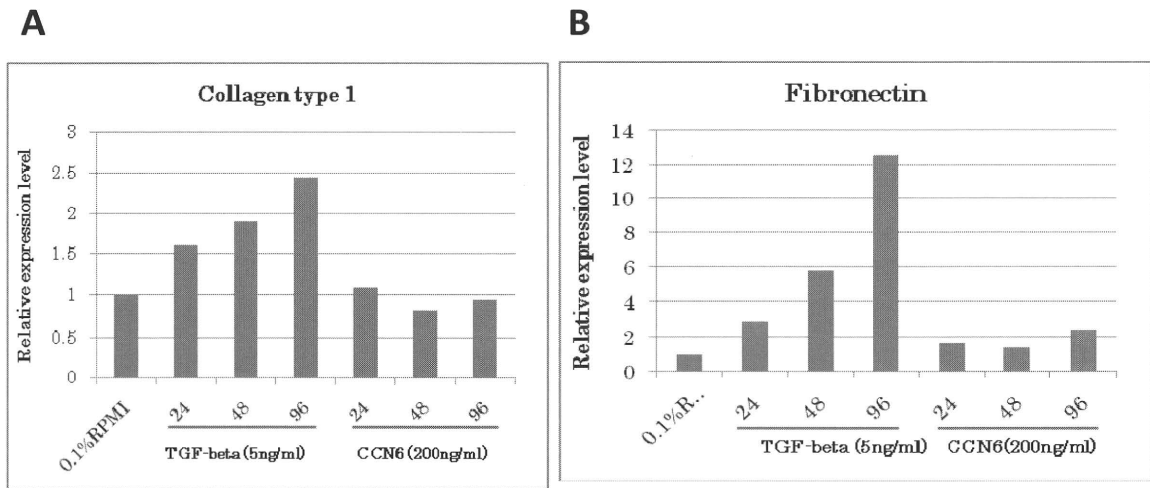


図3 CCN6がcollagenI及びfibronectin産生に及ぼす影響  
TGFβ(5ng/ml)とCCN6(200ng/ml)下で培養したC57BL/6マウス肺線維芽細胞を用い、real-time RT-PCRでcollagen I(3A)とfibronectin(3B)産生量の検討を行った。TGF-β1は経時的にcollagenIとfibronectinの産生を刺激する一方で、CCN6には同様の効果を認めなかった。

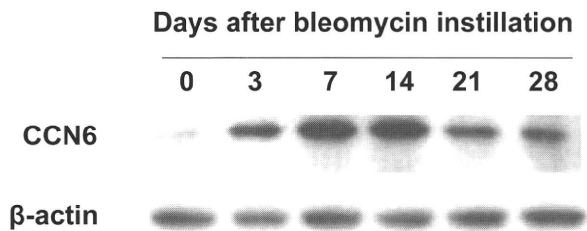


図4 マウスBLM肺線維症モデル肺におけるCCN6/WISP3の発現  
マウス肺線維症モデルの肺homogenateを用い、Western blottingにて経時的なCCN6/WISP3の発現について検討を行ったところ、BLM投与後7～14日目にCCN6/WISP3の発現増加がみられた。

FAKのリン酸化を誘導したことから、CCN6は、少なくともインテグリン-FAKのシグナル伝達経路を介して線維芽細胞に作用していることが明らかとなった。一方、BLM肺線維症モデルでは、CCN6はBLM投与後7～14日において発現増強が認められることから、CCN6は肺線維化早期の線維症進展に関わっている可能性があり、発症早期の治療薬開発の上でkey moleculeとなり得ると考えられた。

参考文献

- 1) 西岡安彦, 曾根三郎. 特発性肺線維症. 別冊日本臨床 呼吸器症候群第2版, 日本臨床社, 大阪, pp416-420, 2008.
- 2) Brigstock DR. The CCN family: a new stimulus

package. J Endocrinol 2003;178: 169-175.

- 3) Pan L-H, Yamauchi K, Uzuki M et al. Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. Eur Respir J 2001;17:1220-1227.
- 4) Allen JT, Knight RA, Bloor CA et al. Enhanced Insulin-Like growth factor binding protein-related protein 2 (connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;21:693-700.
- 5) Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, et al. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1998;275:365-371.
- 6) Frazier K, Williams S, Kothapalli D, et al. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. J Invest Dermatol. 1996; 107, 404-411.
- 7) Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M et al. Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2003;168: 770-778.



## Endothelial-mesenchymal transitionにおける 線維化関連増殖因子の関与

橋本 直純 今泉 和良 長谷川好規\*

特発性肺線維症は、fibroblastic fociの病理学的特徴を有する。線維化病変における線維芽細胞は組織リモデリング、細胞外マトリックスの過剰沈着、そして肺胞上皮との相互作用などで重要な役割を担うと考えられている。我々は、線維化病変で多様な表現型を示す線維芽細胞の中に、新たに微小血管内皮細胞由来の線維芽細胞の存在を同定した。また、血管内皮細胞におけるEndothelial-mesenchymal transition (Endothelial-MT)のprocessにRasの活性化とTGF $\beta$ の共刺激が重要であることも明らかにした。今回、Rasの直接の活性化シグナルであり肺線維症の病態形成において重要な増殖因子とされるPDGFとTGF $\beta$ の共刺激によるEndothelial-MT processの成立の可能性を検討した。PDGFとTGF $\beta$ の共刺激は、血管内皮細胞特異的表現型の有意な発現抑制を誘導した。さらに、1) Endothelial-MTにおけるRasシグナルの直接的な重要性と2) Rasシグナルの制御による血管内皮細胞由来線維芽細胞(Complete Endothelial-MT derived Fibroblasts)の表現型の回復の可能性を検討するために、Ras inhibitorを用いて血管内皮細胞特異的表現型の発現を評価した。興味深いことに、Ras inhibitorの投与は血管内皮細胞のEndothelial-MT processの誘導を抑制したが、形質転換したComplete Endothelial-MT derived Fibroblastsにおける血管内皮細胞の表現型の回復は認めなかった。これらの知見は、早期のRasの活性化とTGF $\beta$ の共刺激に対する制御がEndothelial-MTを介した血管内皮細胞由来線維芽細胞の成立とそれによる線維化病変の形成に対する治療戦略の糸口になる可能性を示した。

### The involvement of fibrosis-related growth factors in endothelial-mesenchymal transition

Naozumi Hashimoto, Kazuyoshi Imaizumi, and Yoshinori Hasegawa

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

The pathological hallmark lesions in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) are the fibroblastic foci, in which fibroblasts are thought to be involved as key mediators of matrix deposition. Our study suggested that endothelial cells may give rise to some population of the lung fibroblast population through an endothelial-mesenchymal transition process comparable to that seen in epithelial-mesenchymal transition (Epithelial-MT). The underlying mechanism might be suggested by the findings that combined treatment with activated Ras and TGF $\beta$  could cause endothelial-mesenchymal transition (Endothelial-MT) in endothelial cells. To evaluate whether combined treatment with PDGF, as an activator of Ras, through PDGF receptor (PDGFR), and TGF $\beta$  can alter the expression of endothelial specific markers on endothelial cells, we examined the effect of the combined treatment in microvascular endothelial cells by flow cytometry. Combined treatment significantly repressed endothelial markers. To examine the direct involvement of Ras in endothelial-MT, the treatment with Ras inhibitor was performed for endothelial cells with activated Ras. Although pre-treatment with Ras inhibitor modulated the restoration of endothelial markers, Ras inhibitor failed to restore the repressive expression of endothelial marker in complete Endothelial-MT cells. These findings suggested that early regulation of Ras signaling and TGF $\beta$  signaling might be involved in the inhibition of endothelial mesenchymal transition.

はじめに

臓器線維症のひとつである特発性間質性肺炎は有効な治療法が確立されていない難治性な呼吸器疾患である。この疾患の特徴的な所見として、著しい線維芽細胞の増殖と遠位側の肺泡領域の閉塞をもたらす細胞外マトリックスの沈着と活動性を示す線維化形成所見である fibroblast foci が挙げられる。線維芽細胞は間質での主要な細胞外マトリックス産生細胞とされているが、多くの表現型において多様性を示している。

そうした中、肺外起源由来として骨髄由来線維芽細胞の存在が報告され(1)、肺内起源由来としても肺胞上皮由来線維芽細胞の存在も報告された(2)。我々は、ブレオマイシン肺線維症モデルにおいて肺微小血管内皮細胞由来線維芽細胞の存在を同定した。今回我々は、endothelial-mesenchymal transition (Endothelial-MT) 過程における活性化 Ras signal と TGFβ signal の関与を検討した。

方 法

血管内皮細胞株 MS1 に対する PDGF と TGFβ の共刺激による血管内皮細胞細胞特異的表現型に対する抑制効果を flow cytometry にて評価した。また、Endothelial-MT 過程における直接的な活性型 Ras の関与を評価するために活性型 Ras 導入株 MS1 細胞 (SVR) に対して Ras の inhibitor である FTI277 の抑制効果を検討した。また、Endothelial-MT が完成した細胞 (complete Endothelial-MT cells; cEMT cells) における Ras の制御効果を検討した。

結 果

血管内皮細胞株への活性型 Ras と TGFβ の影響

a) PDGF と TGFβ の共刺激の血管内皮特異的表現型への影響

血管内皮細胞への活性型 Ras と TGFβ のシグナル相互作用は、血管内皮細胞特異的表現型である CD31, CD34, Tie2, および CD144 の発現を有意に抑

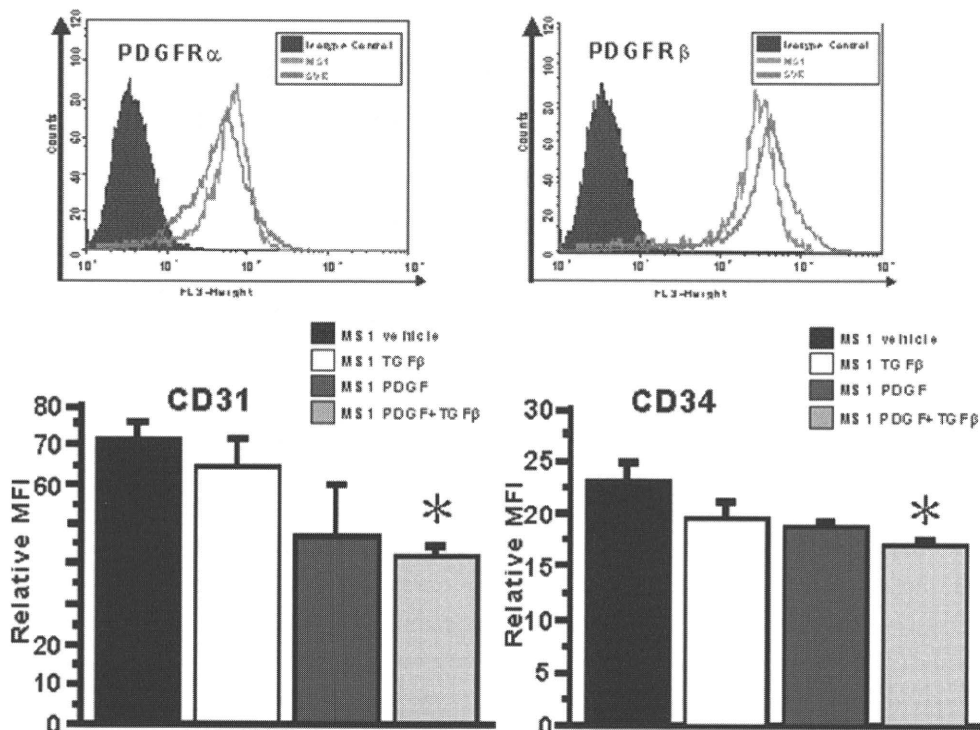


Figure 1

名古屋大学大学院医学研究科呼吸器内科学

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

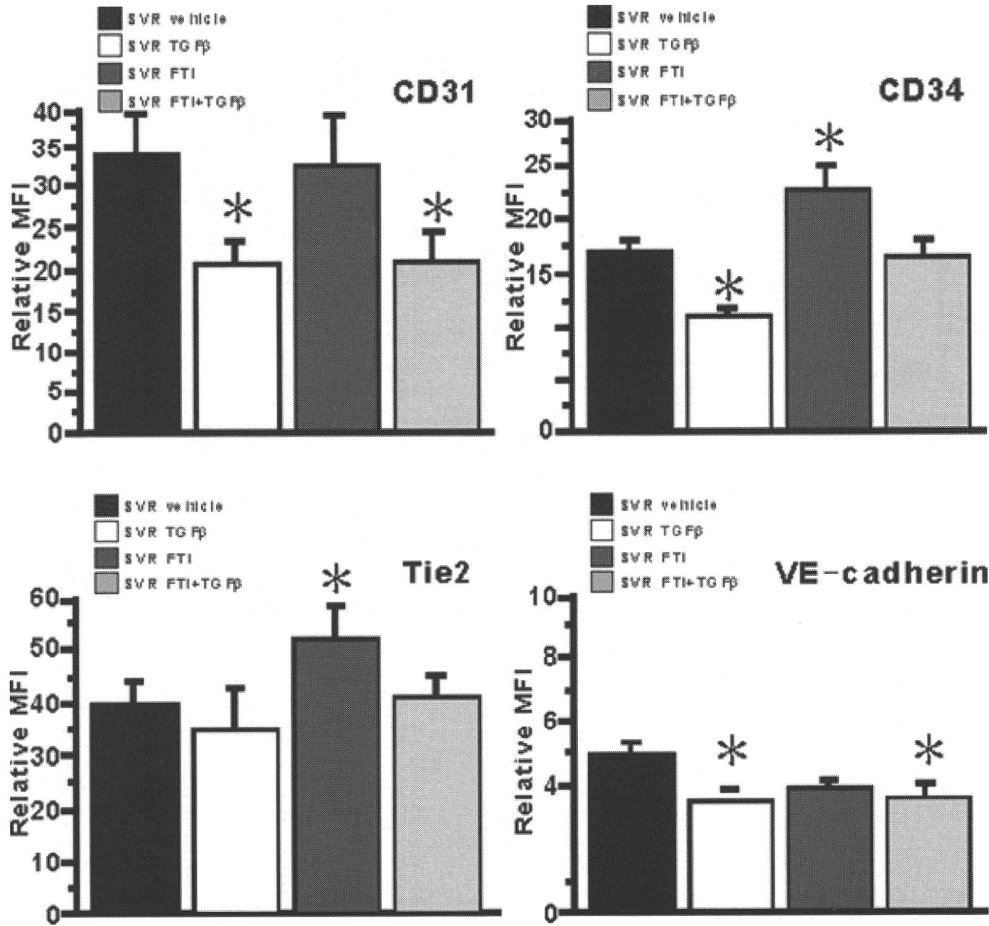


Figure 2

制させることは前回示した。今回我々は、Rasの直接の活性化刺激であり、肺線維症の病態形成に重要とされている増殖因子PDGFをTGFβと共に投与し、血管内皮細胞特異的表現型の発現をflowcytometryにて評価した。PDGFとTGFβの共刺激は、有意に血管内皮細胞特異的表現型の発現抑制を示した(Figure 1)。

b) Rasの活性化シグナルのEndothelia-MTへの直接的関与の検討

Rasの活性化シグナルのEndothelia-MTへの直接的な関与を評価するために、Rasの特異的inhibitorであるFTI277を用いて、血管内皮細胞特異的表現型の発現を評価した。FTI277によるRasの抑制効果は、CD34およびTie2の発現の回復には寄与したが、CD31およびCD144では認めなかった。FTI277の投与はTGFβにより誘導される血管内皮細胞特異的表現型の発現抑制には効果を示さなかった(Figure 2)。

c) cEMT cellsへのRasの活性化シグナル制御効果

TGFβ刺激を受けた活性化Ras(+)SVR細胞は、TGFβ刺激除去後もEndothelia-MTの表現型を維持したが(cEMT cells), それらの細胞はFTI277の投与においても評価したすべての血管内皮細胞特異的表現型の表現型の回復を認めなかった(Figure 3)。

考案・結論

我々は、Tie2Cre/CAG-CAT-LacZ double transgenic miceを作成して、その血管内皮細胞特異的LacZ発現マウスに対して、in vivoブレオマイシン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った。また、in vitroの実験においてもendothelial-MT processに、活性化RasとTGFβの共刺激が重要であることを示した。肺線維症の病態におけるRasの活性化状態を想定するために、Rasの直接的な活性をもたらす、肺線維症の病態形成に重要とされる増殖因子であるPDGFについて注目した。血管内皮細胞に対するPDGFとTGFβの

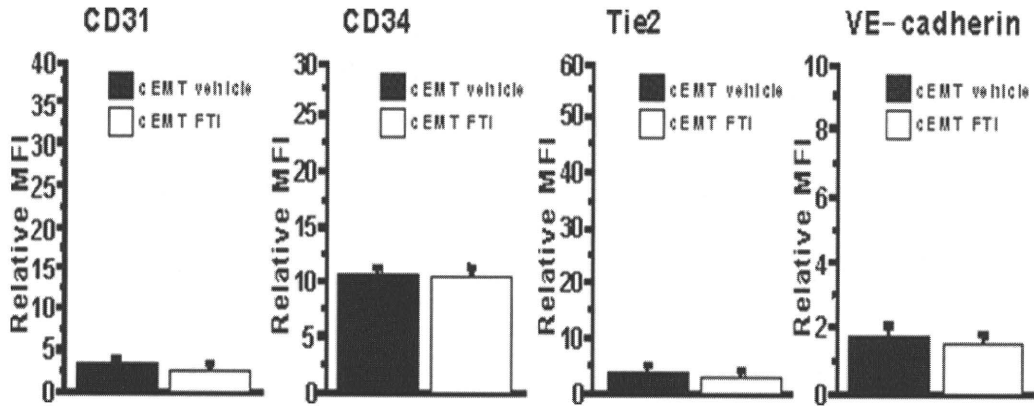


Figure 3

相互作用により血管内皮細胞特異的表現型の有意な抑制を示すことができた。PDGFおよびそのレセプターであるPDGFRのautocrineの刺激がepithelial-mesenchymal transitionの維持に重要であるという報告もなされている(3)。

Endothelial-MTの過程において、活性化Rasが直接的に関与するかどうかを検討するために、RasのinhibitorであるFTI277を用いて血管内皮細胞特異的表現型を評価した。Thieryらによるreviewでも示されているように(4)、Rasの直接的な抑制による血管内皮細胞特異的表現型への効果は、おそらく活性化Rasの下流シグナルにも依存していることが推測された。また、FTI277による活性化Rasのシグナル抑制は、TGFβ刺激によって誘導される血管内皮細胞特異的表現型抑制に対しては効果を示さなかった。このことは、活性化RasとTGFβ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ことが推測された。

興味深いことに、形質転換が完成・維持されたcEMT cellsにおいて、Ras inhibitorは評価したすべての血管特異的表現型の発現回復効果を認めなかった。これらの知見は、早期のPDGF刺激の抑制がブレオマイシン誘導肺線維症に有効であった報告を支持するものと考えられる(5)。

現時点において、COPDや間質性肺炎をはじめとするびまん性肺疾患に対する根治的な治療方法は確立されるに至らず、在宅酸素療法や薬物療法も、生命予後やQOL・運動耐用能の改善にとどまっているのが現状である。

今回の一連の我々の検討は、EMTと同様に、血管内皮細胞がEndothelial-MTを介して線維芽細胞の

一部を構成する可能性を示した。さらに、活性型RasとTGFβのシグナル相互作用が上皮細胞および血管内皮細胞の線維芽細胞への分化を誘導し得ることを明らかにして、そのシグナルによってもたらされる線維芽細胞への誘導をより早期に制御することが線維化病巣の形成に対する知見になりうることを示唆している。

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

血管内皮細胞株において、線維化関連増殖因子であるPDGFとTGFβの共刺激は血管内皮細胞特異的表現型の抑制を誘導した。Ras inhibitorを用いた活性型Rasの直接的な抑制は、活性化Rasにより誘導される血管内皮細胞特異的表現型の回復を誘導したが、TGFβにより誘導される抑制効果を制御できなかった。また、一旦形質転換を示した細胞は活性化Rasの抑制によつては表現型の回復を認めなかった。これらの知見は、早期のEndothelial-MTに対する制御の重要性と形質転換した細胞の表現型回復(mesenchymal-endothelial transition; MET)には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) Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary