

fibrosis. *J Clin Invest*2004;113:243-252.

- 2) Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*2006;103:13180-13185.
- 3) Gotzmann J, Fischer AN, Zojer M, Mikula M, Proell V, Huber H, Jechlinger M, Waerner T, Weith A, Beug H, Mikulits W. A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene*2006;25:3170-3185.
- 4) Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*2006;7:131-142.
- 5) Aono Y, Nishioka Y, Inayama M, Ugai M, Kishi J, Uehara H, Izumi K, Sone S. Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med*2005;171:1279-1285.

## IPFにおける上皮細胞老化について

荒屋 潤 皆川 俊介 野尻さと子 弓野 陽子 小島 淳  
沼田 尊功 原 弘道 河石 真 中山 勝敏 桑野 和善\*

IPF肺では、肺胞構造改変領域を中心にsquamous metaplasiaやbronchiolizationなど上皮細胞の異常な再生を認め、これが肺の線維化に関与している可能性がある。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。また肺線維化進展の中心的役割を果たすサイトカインであるtransforming growth factor (TGF)- $\beta$ は上皮細胞に対して、replicative及びprematureな細胞老化を誘導する。近年細胞老化と関連するclass IIIのHDACであるsirtuin familyが同定され、そのうちSIRT6はDNA修復と関連し、ノックアウトマウスは早老症様の表現型を呈する。そこで我々はIPF肺では気道上皮細胞を含むアポトーシス抵抗性の再生上皮細胞が細胞老化を誘導され、異常なサイトカイン産生からepithelial-mesenchymal interactionにより線維芽細胞へ作用して肺線維化進展に寄与する可能性、さらにはSIRT6がTGF- $\beta$ による老化誘導を制御する事によりその病態に関与する可能性を考え検討を行った。senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal)染色及びp21発現からIPF肺では上皮細胞の老化亢進を認め、in vitroの検討からTGF- $\beta$ が気道上皮細胞老化促進からinterleukin (IL)-1 $\beta$ 分泌による異常なepithelial-mesenchymal interactionを介して線維化病態に関与する可能性と、SIRT6がその過程に抑制的に働きうる事が考えられた。上皮細胞老化がIPFの病態に関与している可能性が示唆された。

### Lung epithelial cell senescence in IPF

Jun Araya, Shunsuke Minagawa, Satoko Nojiri, Yoko Yumino, Jun Kojima, Takanori Numata,  
Hiromichi Hara, Makoto Kawaiishi, Katsutoshi Nakayama, and Kazuyoshi Kuwano.

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

Aberrant re-epithelialization of remodeled airspaces is a prominent pathologic finding in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and is implicated in IPF pathogenesis. Recent studies suggest that epithelial senescence is a risk factor for development of IPF, indicating such aberrant re-epithelialization may be influenced by the acceleration of cellular senescence. Among the sirtuin family, SIRT6, a class III histone deacetylase (HDAC), has been demonstrated to antagonize senescence. We evaluated the senescence of bronchiolization in association with SIRT6 expression in IPF lung. Senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining and immunohistochemical detection of p21 were performed to evaluate cellular senescence. As a model for TGF- $\beta$ -induced senescence of abnormal re-epithelialization, we used primary human bronchial epithelial cells (HBEC). The changes of SIRT6, p21, and interleukin (IL)-1 $\beta$  expression levels in HBEC and alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) expression levels in fibroblasts were evaluated. In IPF lung samples an increase in markers of senescence and SIRT6 expression was found in the bronchial epithelial cells lining cystically remodeled airspaces. We found that TGF- $\beta$  induced senescence in primary HBEC by increasing p21 expression, and while TGF- $\beta$  also induced SIRT6, it was not sufficient to inhibit cellular senescence. However, overexpression of SIRT6 efficiently inhibited TGF- $\beta$ -induced senescence via proteasomal degradation of p21. TGF- $\beta$ -induced senescent HBECs secreted increased amounts of interleukin (IL)-1 $\beta$ , which was sufficient to induce myofibroblast differentiation in fibroblasts. These findings suggest that accelerated epithelial senescence plays a role in IPF pathogenesis through perpetuating abnormal epithelial-mesenchymal interactions, which can be antagonized by SIRT6.

**(はじめに)**

特発性肺線維症(IPF)は病理学的にコラーゲンを中心とするextracellular matrix(ECM)の不規則な沈着に伴う嚢胞性の構造改変と、bronchiolizationやcuboidal metaplasiaなど異常な上皮化が特徴である。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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>、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<sup>3)</sup>。細胞老化は、細胞分裂によるテロメア長の短縮により増殖が制限される結果起こるreplicative senescenceと、酸化ストレスや過度の増殖刺激などにより誘導されるstress-induced premature senescenceに大きく分けられる<sup>4)</sup>。老化細胞は、不可逆性の細胞増殖の停止、アポトーシスへの抵抗性を示し、さらには種々の炎症性サイトカインやgrowth factorの過剰分泌はsenescence associated secretion phenotypeとされ、正常な治癒過程の遅延や、炎症惹起などにより種々の病態への関与が考えられている。

多機能サイトカインであるTransforming growth factor (TGF)- $\beta$ はバラクライン、オートクラインファクターとして作用して、肺の発生においてだけでなく、創傷治癒、線維化病変の形成に重要な役割を果たしており、事実IPFでは、その線維化進展において中心的役割を果たしていると考えられている<sup>5)</sup>。TGF- $\beta$ は上皮細胞に対してreplicative及びpremature senescenceを誘導する事が知られており、さらにTGF- $\beta$ がその細胞内signal transducer proteinであるSmad3を介してtelomeraseのコンポーネントであるhTERT発現を抑制することが報告されている<sup>6)</sup>。これらの事はTGF- $\beta$ が直接的な線維化促進作用だけでなく、上皮細胞の老化を介してIPF病態に関与している可能性を示唆している。

近年酵母の寿命延長に関わる因子として silent

information regulator 2 (Sir2) 遺伝子が同定され、哺乳類にも sirtuin family (SIRT1~7) として存在する事が示された。sirtuin familyはNAD依存性histone deacetylase (HDAC)であり、histone及びp53やNF- $\kappa$ Bなど転写因子の脱アセチル化により代謝、炎症、老化などの細胞機能を調整している<sup>7)</sup>。SIRT1,6のノックアウトマウスにおいて炎症や早老の表現型が認められており、COPD患者由来肺組織でのSIRT1の発現低下と炎症との関連性が明らかにされ、呼吸器病態への関与が示唆された<sup>8)</sup>。SIRT6には活性酸素(ROS)によるDNA傷害を修復するbase excision repair (BER)活性があり<sup>9)</sup>、replicative senescenceの制御機構であるtelomereの代謝と機能調整をする事がさらに報告された<sup>10)</sup>。しかしながらIPF含め肺の病態におけるSIRT6の役割はこれまで明らかになっていない。

今回我々は、IPF肺組織における上皮細胞の加速した老化。またTGF- $\beta$ が肺上皮細胞に細胞老化を誘導し、その老化がSIRT6により制御されている可能性。さらに老化上皮細胞が上皮-間葉系細胞相互作用の観点から線維化進展に影響を与えている可能性を考え検討を行った。

**(対象と方法)**

東京慈恵会医科大学において施行された、肺癌手術検体の癌進展の認められない気道と肺の一部を使用した。(学内倫理委員会承認済み)

**免疫組織学的検討:** OCT compoundを用い肺組織凍結切片を作成し、免疫蛍光染色及び後述のsenescence associated(SA)  $\beta$ -galactosidase (gal)染色を行った。またホルマリン固定肺組織を用いて老化関連cyclin-dependent kinase inhibitorであるp21の免疫組織染色を行った。

**細胞培養分離:** 肺がん手術検体の肺実質正常部位を約1~2mm程度の組織片とし、培養プレート上で培養した。約2週間程度で線維芽細胞の増殖が認められた。細胞は10%FCSを含むDMEMにて培養した。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。分離した上皮細胞は10 $\mu$ 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。

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

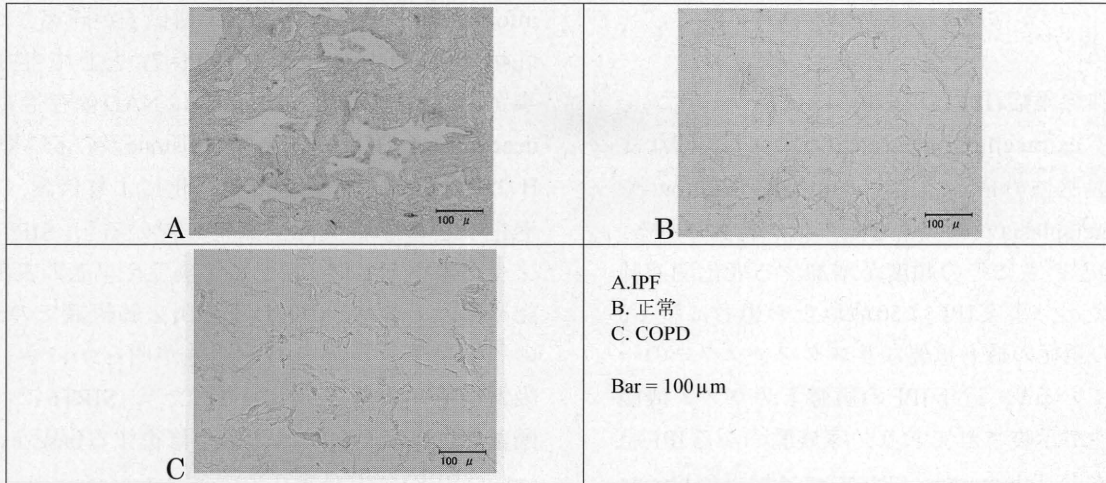


図1 IPF肺における上皮細胞老化(senescence associated  $\beta$ -galactosidase 染色)

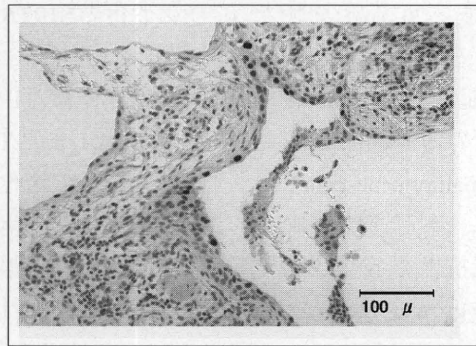


図2 IPF肺における上皮細胞老化(p21 免疫組織染色)

**発現遺伝子導入による過剰発現と siRNA による knock down** : SIRT6 wild type 発現プラスミド(Chua KF Stanford 大学より供与)及び hTERT 発現プラスミド, SIRT6 siRNA 及び p21 siRNA を Amaxa Neuclofactor system を使用し遺伝子導入した。

**遺伝子発現** : semiquantitative RT-PCR により半定量的に行った。

**蛋白発現** : Western blotting 法により検討した。

**細胞周期検討** : propidium iodide(PI)染色による DNA 含量の検討により行った。(flowcytometry 法)

**細胞老化の検討** : SA  $\beta$ -gal ( $\beta$ -galactosidase staining kit) 染色で検討した。

(結 果)

1. IPF 肺組織において上皮細胞の老化亢進を認める。

正常肺組織(6例, 平均 62.7 歳), COPD 肺組織(6例,

平均 66.3 歳), IPF 肺組織(6例, 平均 64.8 歳) 肺組織の凍結切片を用いた SA  $\beta$ -gal 染色では, IPF 全例の肺の bronchiolization, cuboidal metaplasia, squamous metaplasia など内腔を覆う上皮細胞に染色を認めた(図 1-A)。一方, 正常肺及び COPD 肺組織では上皮細胞に明らかな染色陽性は認めなかった(図 1-B,C)。また p21 免疫組織染色でも正常肺組織では染色を認めず, IPF 肺組織では上皮細胞に陽性細胞を認めた(図 2)。IPF 肺組織内で正常領域, 活動性のある線維化領域, 早期線維化巣, のう胞化した晚期線維化領域に分けて p21 の陽性率を半定量的に検討した。正常及び完成された線維化領域ではほとんど染色を認めず, 一方活動性のある線維化領域, 早期線維化巣を覆う上皮細胞では 20% 以上に陽性細胞を認めた。また SIRT6 による免疫蛍光染色では同様に正常肺では染色を認めず, IPF 肺組織では構造改変領域の内腔を覆う上皮細胞に強い染色を認めた(図 3-A,B)。

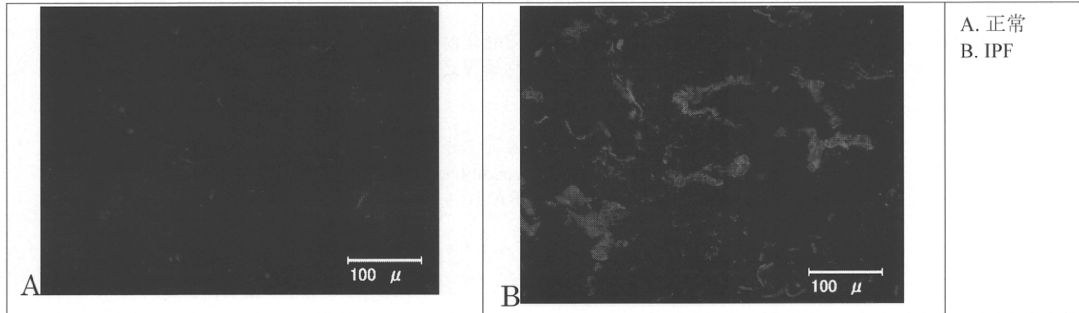


図3 IPF肺におけるSIRT6発現(SIRT6免疫蛍光染色)

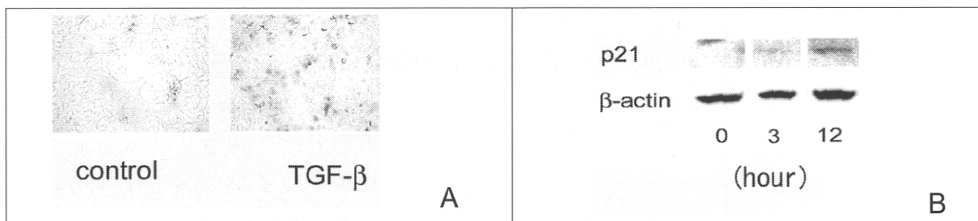


図4 TGF-βによる気道上皮細胞の老化誘導

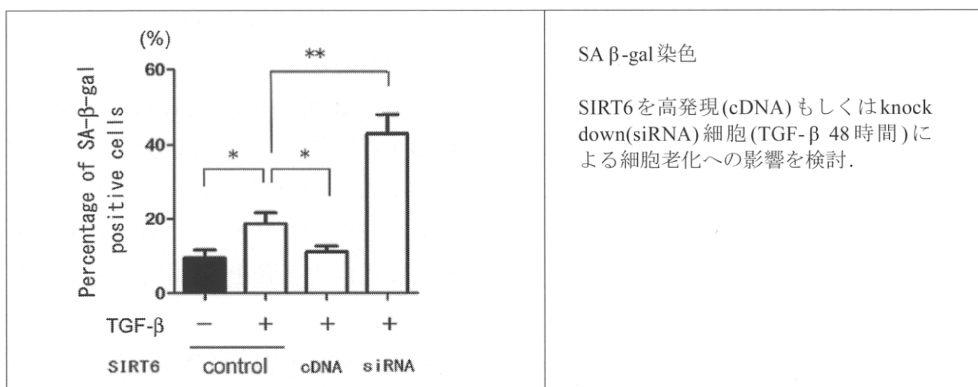


図5 SIRT6によるTGF-β誘導気道上皮細胞老化の抑制

**2. TGF-βは気道上皮細胞にp21発現を介して老化を誘導する。**

正常気道から分離培養した気道上皮細胞を、TGF-β (2ng/ml) で48時間刺激後に細胞老化をSA β-gal染色、p21発現及び細胞周期分析にて検討した。SA β-gal染色ではTGF-βは約50%の細胞に老化を誘導した(図4-A)。同時にp21の発現増加を認め、細胞周期分析でのG1/G0期の細胞分画が平均43.5%から平均55.2%に増加し細胞周期停止をきたしていると考えられ、さらにその後の48時間の培養でも平均57.3%であり、不可逆性変化と考えられた(図4-B)。またp21siRNAはTGF-βによる気道上皮細胞老化を抑制した。

**3. SIRT6はTGF-βによる気道上皮細胞老化を制御する。**

SIRT6の細胞老化に与える影響を明らかにする

ため、wild type SIRT6発現プラスミド及びSIRT6 siRNAを遺伝子導入し検討した。それぞれ効率よく発現が誘導またはknock downされた。さらにこれらの細胞でTGF-β(2ng/ml) 48時間刺激後に細胞老化を検討した。SIRT6高発現細胞ではTGF-βによる老化誘導が抑制され、またknock down細胞では細胞老化の亢進を認めた。また同様にSIRT6高発現はp21発現を抑制し、逆にknock downはp21発現を亢進させた(図5)。

**4. TGF-βにより老化が誘導された気道上皮細胞はIL-1β産生を介して筋線維芽細胞を誘導する。**

TGF-βにより老化が誘導された気道上皮細胞ではIL-1β発現が亢進しており、これはSIRT6高発現による老化抑制により低下した。老化気道上皮細胞培養液(48時間培養)で線維芽細胞を刺激(48時間)したところ、線維芽細胞でα-smooth muscle actin (SMA)

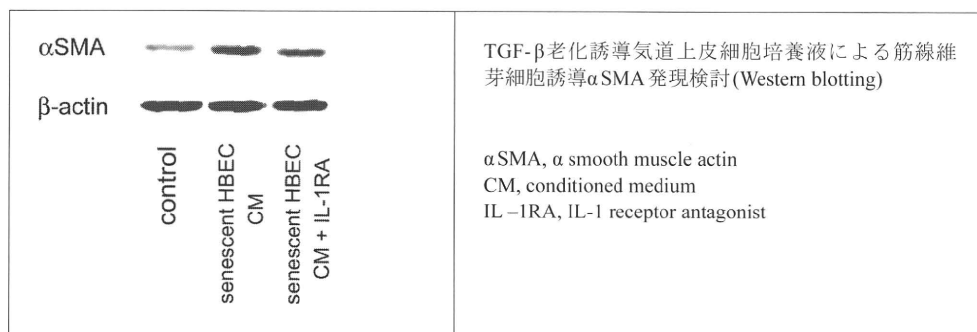


図6 TGF-β老化誘導気道上皮細胞におけるIL-1β発現と筋線維芽細胞誘導

発現が亢進し、これはIL-1 receptor antagonistを培養液に加えることにより抑制された。(図6)

(考 察)

IPF肺組織のbronchiolization, cuboidal metaplasia, squamous metaplasiaなど内腔を覆う異常な上皮細胞に細胞老化の亢進を認め、p21陽性細胞の分布からはIPF組織内でも正常及び完成した線維化部位よりも、早期線維化巣を含む活動性の高い線維化病変を覆う上皮細胞での老化がより亢進していた。つまり、線維化病態進展の早期段階からの上皮細胞老化の病態への関与が考えられた。IPFの肺の肺胞内微小環境においてはTGF-β, Fas ligand, 活性酸素など、pro-apoptoticな刺激が豊富に存在し、正常な肺胞上皮細胞に対してapoptosisを誘導している<sup>11,12)</sup>。そのため傷害部位を再上皮化するbronchiolization, cuboidal metaplasia, squamous metaplasiaなどの上皮細胞は相対的にapoptosis抵抗性である必要がある。apoptosis抵抗性上皮細胞による再上皮化後もpro-apoptoticな刺激が持続的に存在するため、結果的に細胞老化を誘導している可能性がある。事実今回我々の検討でも、肺胞上皮細胞と比べてapoptosis抵抗性である気道上皮細胞に対してTGF-βは細胞老化を誘導した。TGF-βは不活性型で存在し、その活性化機序が機能制御の上で重要であり、活性酸素はその活性化因子である。つまりIPF病態における過剰な活性酸素の存在はそれ自体、さらにはTGF-βの活性化を介して上皮細胞老化に関わる可能性がある<sup>13)</sup>。

我々は老化が誘導された上皮細胞が線維化進展に関与する可能性を、epithelial-mesenchymal interactionの観点から明らかにした。老化誘導され

た細胞は炎症性サイトカインやgrowth factorを過剰分泌することが知られており、事実我々がTGF-βにより細胞老化を誘導した気道上皮細胞では代表的炎症性サイトカインであるIL-1β産生が亢進していた。またこのIL-1βがパラクラインファクターとして作用して、線維芽細胞に筋線維芽細胞を誘導することがIL-1 receptor antagonistによるαSMA発現抑制から明らかとなった。パラクラインファクターを介するepithelial-mesenchymal interactionは正常な器官形成だけでなく、気道を含む呼吸器疾患においても重要な役割を果たすことが明らかとなっている。今後、老化を含めた上皮細胞のphenotypeが線維芽細胞に及ぼす影響をさらに詳細に検討する必要がある。

COPDでのSIRT1発現低下による炎症への影響以外はsirtuin familyの呼吸器病態への関与はほとんど明らかとなっていない<sup>8)</sup>。今回SIRT6がIPFの上皮細胞で高発現しており、TGF-βによる気道上皮細胞老化誘導をp21のプロテアソームによる分解により細胞老化を制御している可能性が示唆された。細胞老化が腫瘍発生制御の機序の一つと考えられている点からは、細胞老化に対する治療は慎重な検討が必要である。しかしながらSIRT6が細胞老化の制御という点から、IPF病態理解のうえで重要な分子である可能性があり、その治療的な側面に関してもさらなる検討が必要であると考えている。

(結 論)

IPF肺組織ではbronchiolizationを含む異常な再生上皮細胞の細胞老化が亢進しており、epithelial-mesenchymal interactionにより線維化進展に寄与し、SIRT6が細胞老化制御によりその病態にかかわる可

能性が示唆された。今後、上皮細胞老化の線芽細胞に及ぼす影響とSIRT6による細胞老化制御の機序に関してさらに詳細な検討を行う予定である。

## 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: 646–64.
- 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) Passos JF, Saretzki G, von Zglinicki T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res.* 2007; 35:7505-13.
- 5) Sheppard D. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3:413-7.
- 6) Li H, Xu D, Li J, Berndt MC, Liu JP. Transforming growth factor beta suppresses human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by Smad3 interactions with c-Myc and the hTERT gene. *J Biol Chem.* 2006; 281:25588-600.
- 7) Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 2006; 20:2913-21.
- 8) Rajendrasozhan S, Yang SR, Kinnula VL, Rahman I. SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177:861-70.
- 9) Mostoslavsky R, et. al.. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 2006;124:315-29.
- 10) Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, Cheung P, Kusumoto R, Kawahara TL, Barrett JC, Chang HY, Bohr VA, Ried T, Gozani O, Chua KF. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature.* 2008; 27: 492-6.
- 11) Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I, Yoshimi M, Nakamura N, Fujita M, Maeyama T, Hara N. TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol* 2002; 168(12): 6470-8.
- 12) Cantin AM, North SL, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG. Oxidant-mediated Epithelial Cell Injury in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Clin Invest* 1987; 79: 1665-1673.
- 13) Pociask DA, Sime PJ, Brody AR. Asbestos-derived reactive oxygen species activate TGF-beta1. *Lab Invest* 2004; 84(8): 1013-23.

【平成21年度】

## ブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおける PDGFレセプター $\alpha$ , $\beta$ 阻害抗体の抗線維化効果

西岡 安彦\* 岸 昌美 青野 純典 東 桃代 曾根 三郎

我々は、がん分子標的治療薬であるイマチニブの肺線維症抑制効果について報告してきた。イマチニブはPDGFレセプター(PDGFR)のリン酸化阻害を介してブレオマイシンモデルマウスに対する抗線維化効果を発揮するが、イマチニブの抗線維化効果におけるPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ の個々の役割は不明な点が多い。最近の報告ではイマチニブのIPFに対する治療効果は証明されず、PDGFRを介した治療戦略をIPFに応用するには更なる検討が必要と考えられる。今回我々は肺線維症におけるPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ の役割を明らかにするため、PDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ に対する特異的阻害抗体を用いて、ブレオマイシンモデルマウスにおける抗線維化効果について検討した。まず、マウス肺線維芽細胞のPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ 発現をフローサイトメトリーで確認した。マウス肺線維芽細胞を培養し、PDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ の特異的阻害抗体であるAPA5, APB5がPDGF-AA, BBの増殖作用を抑制することを確認した。次にブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスを用いて、APA5, APB5の抗線維化効果を検証した。その結果、マウス肺線維芽細胞にPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ は同等に発現していた。マウス肺線維芽細胞のPDGF-AA, BBによる増殖作用をAPA5, APB5は特異的に抑制した。ブレオマイシン誘発肺線維症は、APB5投与群のみで有意に抑制された。肺線維化形成にはPDGFR- $\beta$ がより重要な役割を果たしていることが推測され、抗PDGFR- $\beta$ 抗体による抗線維化療法の可能性が示唆された。

### **Anifibrotic Effects of Blocking Antibody Specific for PDGF Receptor- $\alpha$ or $\beta$ on Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice**

Yasuhiko Nishioka, Masami Kishi, Momoyo Azuma, Yoshinori Aono, and Saburo Sone

*Department of Respiratory Medicine and Rheumatology The University of Tokushima Graduate School*

Idiopathic pulmonary fibrosis is a progressive and lethal pulmonary disorder. We reported that imatinib prevented bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis in mice via inhibiting phosphorylation of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). Since imatinib can inhibit both PDGFR- $\alpha$  and  $\beta$ , the role of inhibition of PDGFR- $\alpha$  or  $\beta$  in antifibrotic effects of imatinib is still unclear. To clarify the role of each PDGFR, we used the blocking antibody specific for PDGFR- $\alpha$  or  $\beta$  in BLM-induced pulmonary fibrosis model in mice. First we confirmed the expression of PDGFRs in murine lung fibroblasts by a flow cytometric analysis. Next we examined inhibitory effects of APA5 and APB5 on the growth of lung fibroblasts stimulated with PDGF by using  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation assay. Then we investigated whether APA5 and APB5 could prevent lung fibrosis in BLM-model of C57BL/6 mice. Mice were treated i.p. with 1mg of APA5 or APB5 every other day, and assessed pulmonary fibrosis by Ashcroft score on day28.

Expressions of PDGFR- $\alpha$  and  $\beta$  in murine lung fibroblasts were similar. Addition of APA5 and APB5 inhibited the growth of fibroblasts induced by PDGF-AA and BB, respectively. APB5 prevented the growth of fibroblasts more strongly than APA5. In addition, administration of APB5 was more effective in inhibiting pulmonary fibrosis than APA5 in BLM-induced model. It is likely that the PDGFR- $\alpha$  and  $\beta$  play a different role in BLM-induced pulmonary fibrosis in mice. The specific approach using the blocking antibody for PDGFR- $\beta$  might be more useful for treatment of pulmonary fibrosis.

## はじめに

特発性肺線維症は慢性進行性の肺疾患であり、いまだ生命予後を延長する治療法が確立されておらず新規治療法の開発が望まれている。我々は血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor : PDGF)に注目し、PDGFR阻害薬であるイマチニブの肺線維症における抗線維化効果について検討してきた<sup>1)</sup>。その結果、線維化後期ではイマチニブによる抗線維化効果がAGPにより阻害されるが、マクロライドとの併用によりAGPの抑制効果が解除され、抗線維化効果が増強すること、線維化早期においてもイマチニブはPDGFR阻害作用を介してfibrocyteの遊走抑制作用を示し、抗線維化効果を発揮することを報告した<sup>2, 3)</sup>。

一方、肺線維症においてPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ のいずれがより重要な役割を果たしているかは明らかでない。肺胞上皮にもPDGFR- $\alpha$ が発現していることが報告されており<sup>4)</sup>、肺胞上皮の再生・増殖においてもPDGFR- $\alpha$ は重要な役割を果たしている可能性が示唆される。以上から、今回我々は肺線維症におけるPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ の役割をより詳細に検討するため、PDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ に特異的な阻害抗体を用いてプレオマイシン肺線維症モデルにおける抗線維化効果を検討した。

## 方 法

PDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ の特異的阻害抗体APA5, APB5(理化学研究所 西川先生より供与)を使用した<sup>5)</sup>。APA5, APB5はハイブリドーマ細胞の培養上清から硫酸沈殿あるいはProteinGカラムにより精製した。肺線維芽細胞のPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ の発現をフローサイトメトリーで確認した。マウス肺線維芽細胞を培養し、APA5, APB5がPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ のリン酸化阻害効果を持つことをWestern blottingで確認し、PDGF-AA, BBによる増殖作用を特異的に阻害することを<sup>3</sup>H-thymidine incorporation assayを用いて検証した。最後にプレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスを

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

用いて、APA5, APB5の抗線維化効果を比較した。モデルマウスは5週齢のC57/BL6マウスにプレオマイシン140mg/kgをAltzet Osmotic Minipump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た。APA5, APB5は、1mgずつ隔日で腹腔内投与した。28日目にマウスをsacrificeし、HE染色による組織学的な線維化の評価(Ashcroft score)を行った。次にマウス肺胞上皮におけるPDGFRの発現を確認するため、PDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ 抗体を用いた免疫組織染色を行った。さらに、上皮障害修復過程に与える影響を検討するため14日目の炎症期に肺胞洗浄を行いBALF中の細胞数を集計した。同時期に肺胞上皮において分裂期にある細胞数を確認するためKi67抗体を用いた免疫組織染色を実施した。

## 結 果

フローサイトメトリーによる解析から、C57BL/6由来およびCCL-206マウス肺線維芽細胞には、PDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ が同等に発現していた(図1)。一方、PDGF-AA, BB(10ng/ml)はそれぞれPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ のリン酸化を誘導し、APA5およびAPB5 (10 $\mu$ g/ml)は、PDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ のリン酸化を抑制した(図2)。次に、マウス肺線維芽細胞のPDGF-AA, BB(10ng/ml)による増殖作用に対するAPA5, APB5の効果を検討したところ、APA5, APB5はそれぞれ特異的にPDGF-AAおよびBBによる肺線維芽細胞の増殖を抑制した。APB5はAPA5より強く、用量依存的な抑制効果を示した(図3)。最後に、プレオマイシン誘発肺線維症モデルを用いて、APA5およびAPB5の抗線維化効果を検討した。肺線維症は、APB5の投与で有意に抑制されたが、APA5には抑制効果を認めなかった(図4, 5)。IPF肺およびプレオマイシンモデルマウスの肺において、PDGFR- $\alpha$ はより強く肺胞上皮細胞上に発現しており、PDGFR- $\beta$ は主として間質に発現していることを免疫組織染色で確認した(図6)。炎症期のプレオマイシンモデルマウスにおいて、BALFを行い細胞数を集計したところ有意な差はなく、炎症の程度に違いは認めなかった(図7)。肺胞上皮細胞修復の過程にあると考えられる分裂期の細胞数を確認するためKi67染色を行ったところ、生食群と比較して、プレオマイシン投与群では肺胞上皮細胞のKi67陽性細胞が増加してい

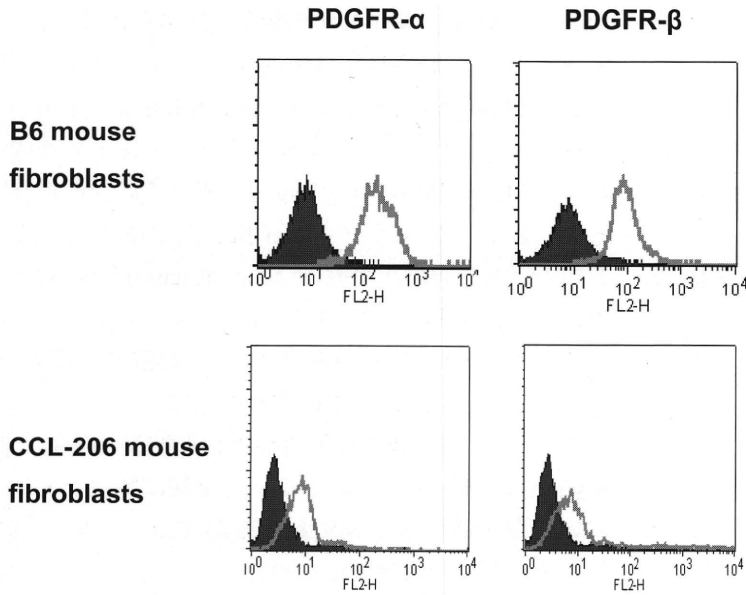


図1. マウス肺線維芽細胞におけるPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ の発現  
C57/BL6, CCL-206マウス肺線維芽細胞のPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ の発現をフローサイトメトリーで確認した. いずれの細胞株においても, PDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ は同等に発現していた.

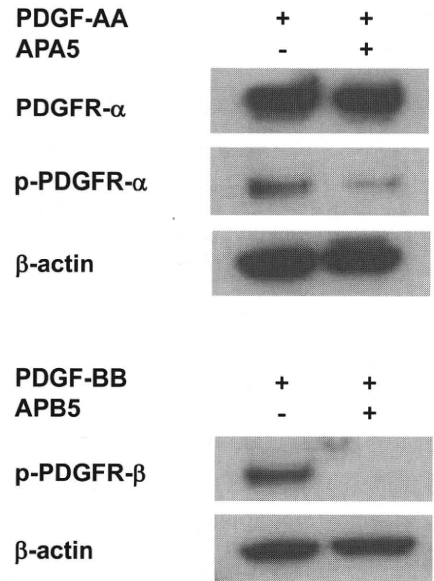


図2. APA5, APB5によるPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ のリン酸化阻害効果  
APA5, APB5(10  $\mu$ g/ml)はPDGF-AA, BB(10ng/ml)によるPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ のリン酸化を抑制する効果があることを, Western blottingで確認した.

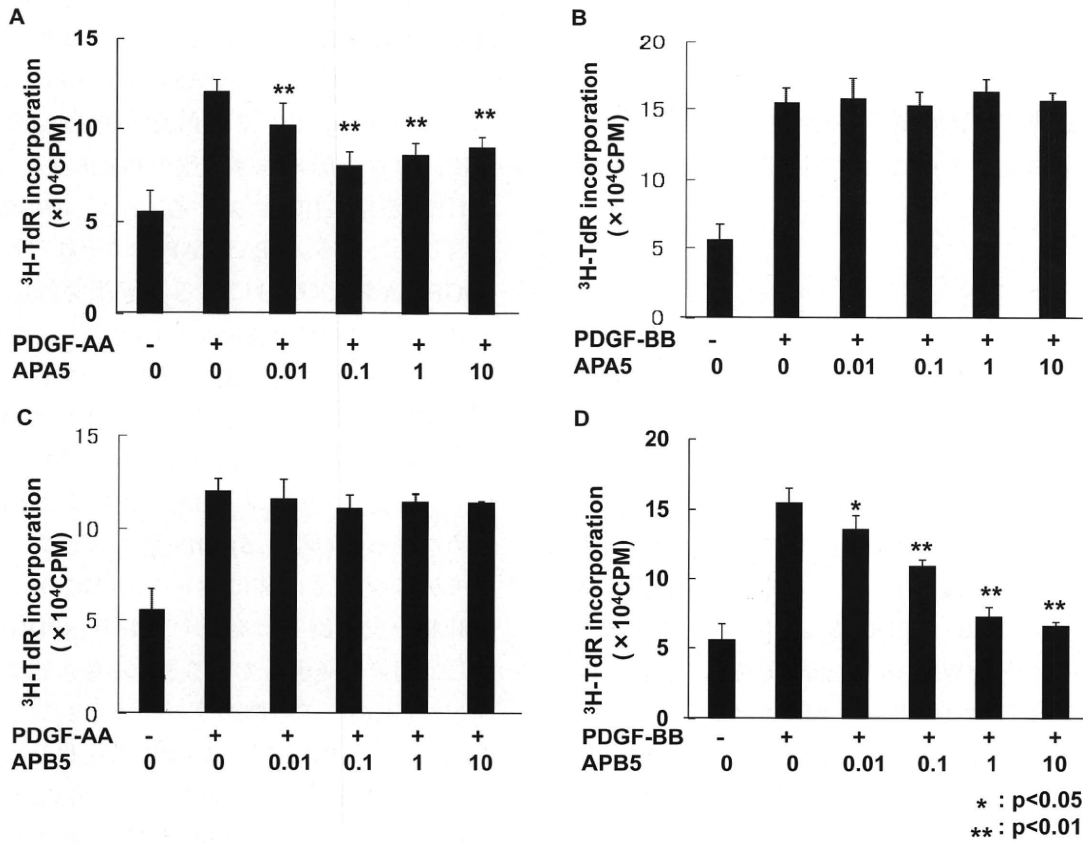


図3. APA5, APB5によるマウス肺線維芽細胞の増殖抑制効果  
A: APA5はPDGF-AA (10ng/ml)による増殖作用を抑制した. B: APA5はPDGF-BBによる増殖作用を抑制しなかった. C: APB5はPDGF-AAによる増殖作用を抑制しなかった. D: APB5はPDGF-BB (10ng/ml)による増殖作用を容量依存的に抑制した.

\* : p<0.05  
\*\* : p<0.01

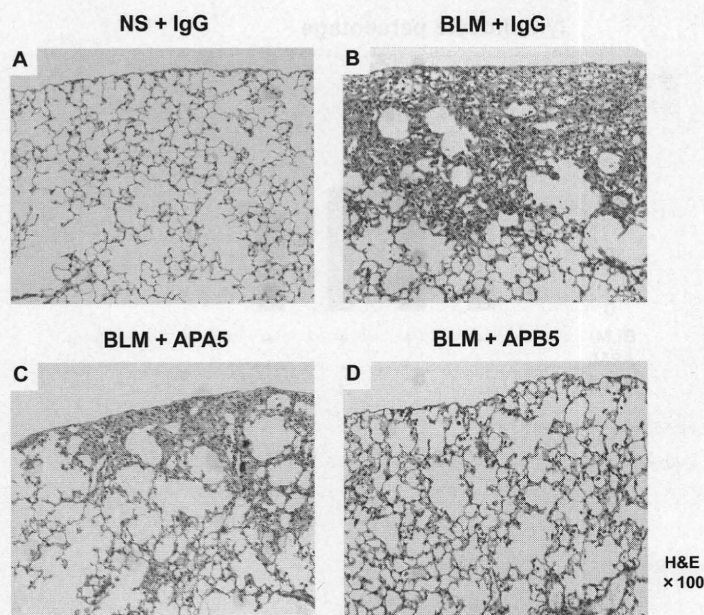


図4. プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおけるAPA5, APB5の肺線維化抑制効果  
H&E染色

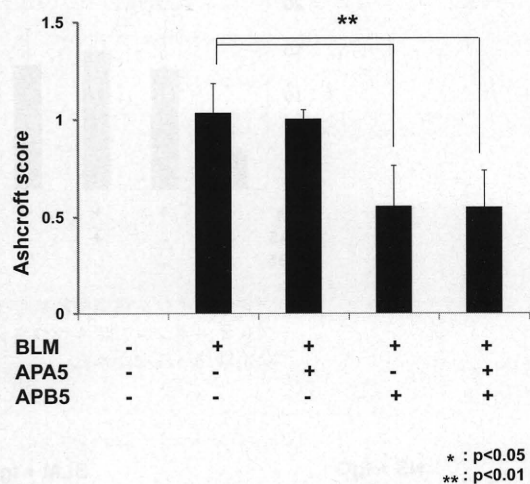


図5. プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおけるAPA5, APB5の肺線維化抑制効果  
Ashcroft scoreはAPB5で有意に抑制されたが、APA5においては抑制されなかった。

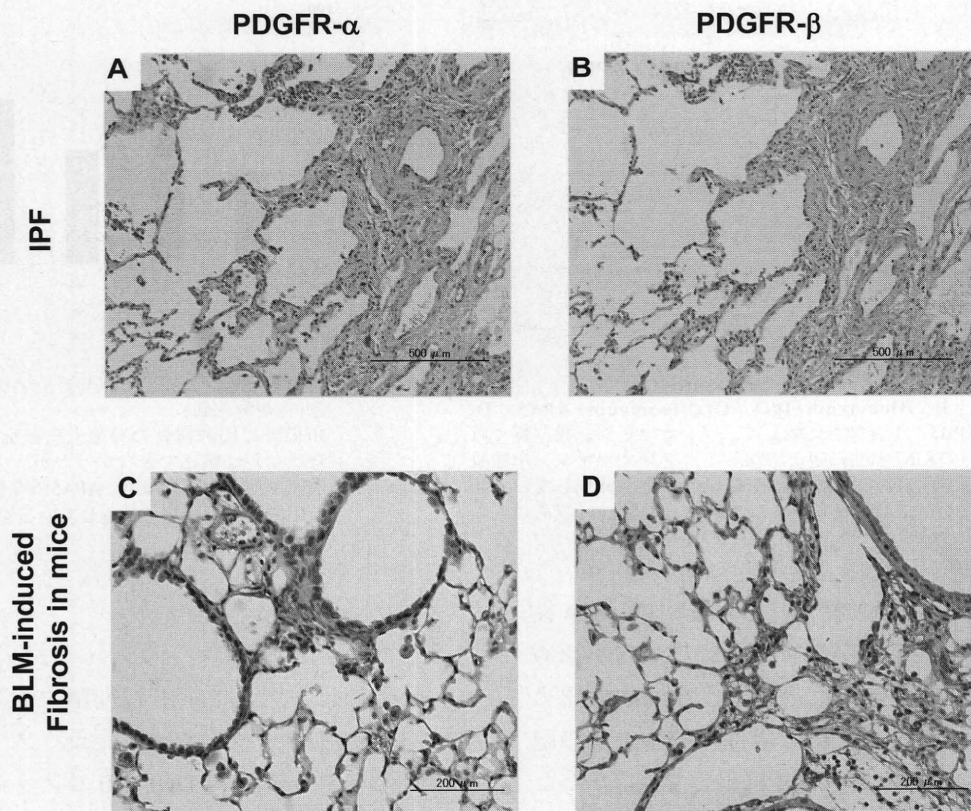


図6. IPF肺およびプレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスの肺におけるPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ の局在  
IPF肺およびプレオマイシンモデルマウスの肺において、PDGFR- $\alpha$ はより強く肺胞上皮細胞上に発現しており、PDGFR- $\beta$ は主として間質に発現していることを免疫組織染色で確認した。

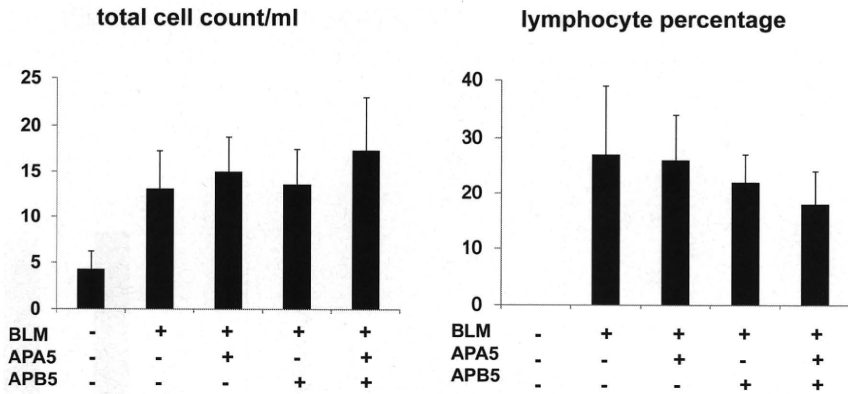


図7. プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスのBALF所見  
 プレオマイシンモデルマウスにおいてday14にBALFを行い細胞数を集計したところ有意な差は見られなかった。

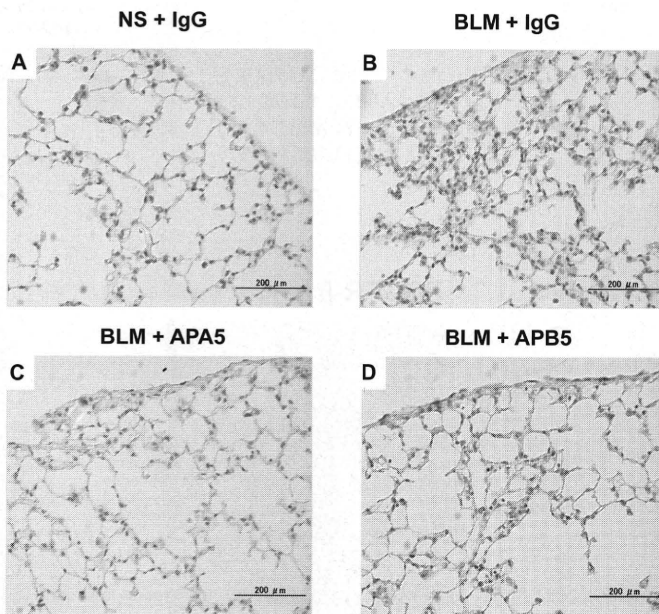


図8. プレオマイシン肺線維症モデルマウス肺のKi-67染色  
 A: NS+IgG B: Bleomycin+IgG C: Bleomycin+APA5 D: Bleomycin+APB5 生食群と比較して、プレオマイシン投与群では肺胞上皮細胞のKi67陽性細胞が増加した。プレオマイシン単独投与群と比較して、APA投与群ではKi67陽性細胞が減少している傾向が認められたが、APB投与群ではそのような傾向は認められなかった。

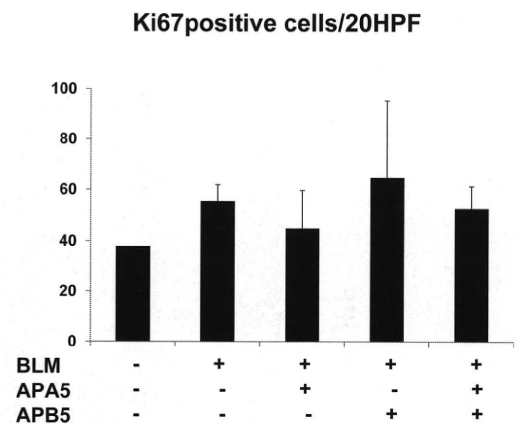


図9. プレオマイシン肺線維症モデルマウス肺のKi67染色(定量的評価)  
 20視野でKi67陽性の肺胞上皮細胞数を集計した。有意な差は確認できなかったが、プレオマイシン単独投与群と比較して、APA5投与群にて肺胞上皮のKi67陽性細胞数が減少している傾向が見られた。

た。プレオマイシン単独投与群と比較して、APA投与群ではKi67陽性細胞が減少している傾向が認められたが、APB投与群ではそのような傾向は認められなかった。20視野でKi67陽性の肺胞上皮細胞数を集計したところ、有意な差は確認できなかったが、プレオマイシン単独投与群と比較してAPA5投与群にて肺胞上皮のKi-67陽性細胞数が減少している傾向が見られた(図8, 9)。

### 考 察

胎生期におけるPDGFの役割には違いがあり、PDGF-AAをノックアウトしたマウスでは肺気腫様の変化が生じるが、PDGF-BBのノックアウトマウスでは肺形成に及ぼす効果は報告されていない<sup>6)</sup>。また、ヒト線維化肺で肺胞上皮細胞にPDGFR- $\alpha$ が優位に発現しているという報告があり、肺胞上皮傷害の修復過程にPDGFR- $\alpha$ が関与している可能性

がある<sup>6)</sup>。以上から、PDGFR- $\alpha$ とPDGFR- $\beta$ では、肺線維症において異なる役割を果たしている可能性がある。一方、PDGFR- $\alpha$ の阻害は、肺胞上皮細胞の障害修復過程に影響を及ぼす可能性があり、PDGFRを標的とした抗線維化療法を考慮する場合PDGFR- $\alpha$ の働きを阻害しない形でのアプローチがより有効と考えられる。

今回の実験でもAPB5を用いた群で優位に線維化を抑制する傾向があり、肺線維化においてはPDGFR- $\beta$ 単独を標的とする方がより良好な治療効果が期待できると考えられる。今後の課題として、抗PDGFR抗体を用いてPDGFR- $\alpha$ ,  $\beta$ の肺胞上皮傷害への関与を検証していくとともに、PDGFR- $\beta$ 単独を阻害する治療の有用性を確認していく予定である。

#### 参考文献

- 1) Aono Y, Nishioka Y, Inayama M, Ugai M, Kishi J, Uehara H, Izumi K, Sone S. Imatinib as a Novel Antifibrotic Agent in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1279-1285.
- 2) Azuma M, Nishioka Y, Aono Y, Inayama M, Makino H, Kishi J, Shono M, Kinoshita K, Uehara H, Ogushi F, Izumi K, Sone S. Role of alpha1-acid glycoprotein in therapeutic antifibrotic effects of imatinib with macrolides in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 76: 1243-1250.
- 3) 西岡安彦, 青野純典, 東 桃代, 木下勝弘, 片岡昌美, 曾根三郎. 骨髄由来fibrocyteとPDGFシグナル. 第48回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム4 社会のニーズに応える呼吸器学の展開-肺損傷から線維化へのパラダイムとその制御- 2008年6月
- 4) Kirsi V, Steffen O, Outi L, Kaisa S, Marjukka M, Vuokko L K Peroxiredoxin II expression and its association with oxidative stress and cell proliferation in human idiopathic pulmonary fibrosis. *J Histochem Cytochem*. 2008; 56: 951-959.
- 5) Sano H, Sudo T, Yokode M, Murayama T, Kataoka H, Takakura N, Nishikawa S, Nishikawa S, Kita T. Functional blockade of Platelet-Driven Growth Factor Receptor- $\beta$  but not of Receptor- $\alpha$  prevents vascular smooth muscle cell accumulation in fibrous cap lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2001; 103: 2955-2960.
- 6) Boström H, Gritli-Linde A, Betsholtz C. PDGF-A/PDGF alpha-receptor signaling is required for lung growth and the formation of alveoli but not early branching morphogenesis. *Dev Dyn* 2002; 223: 155-162.

【平成21年度】

## 血管抑制因子 vasohibin の線維化病態における役割

玉井ときわ<sup>1,2</sup> 廣田 直<sup>1</sup> 柴田 尚子<sup>1</sup> 太田 洋充<sup>1</sup>  
久田 修<sup>1</sup> 貫和 敏博<sup>1</sup> 佐藤 靖史<sup>2</sup> 海老名雅仁<sup>1\*</sup>

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

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

Tokiwa Tamai<sup>1,2</sup>, Nao Hirota<sup>1</sup>, Naoko Shibata<sup>1</sup>, Hiromitsu Ohta<sup>1</sup>,  
Shu Hisata<sup>1</sup>, Toshihiro Nukiwa<sup>1</sup>, Yasufumi Sato<sup>2</sup>, and Masahito Ebina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine,  
1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, 980-8574, Japan,

<sup>2</sup>Department of Vasacular Biology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University,  
4-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, 980-8575, Japan.

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

## 背景

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

## 方法

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

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

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

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

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

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

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

<sup>1</sup> 東北大学大学院医学系研究科 呼吸器病態学

<sup>2</sup> 東北大学加齢医学研究所 腫瘍循環

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

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

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

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

## 結果と考察

### 線維化肺におけるVASH-1の局在

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

### 培養筋線維芽細胞におけるVASH-1の発現の検討

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

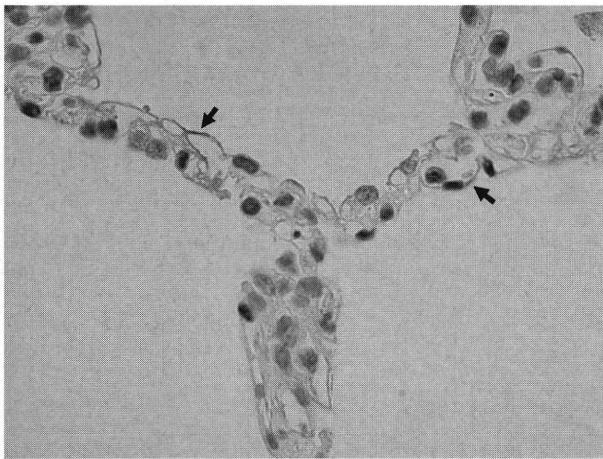


図1：IPF患者肺内血管増殖病変におけるVASH-1発現  
IPF患者の外科的生検肺において肺胞壁毛細血管増殖病変における血管内皮細胞の一部にVASH-1(矢頭)の発現を認める(X1000)。

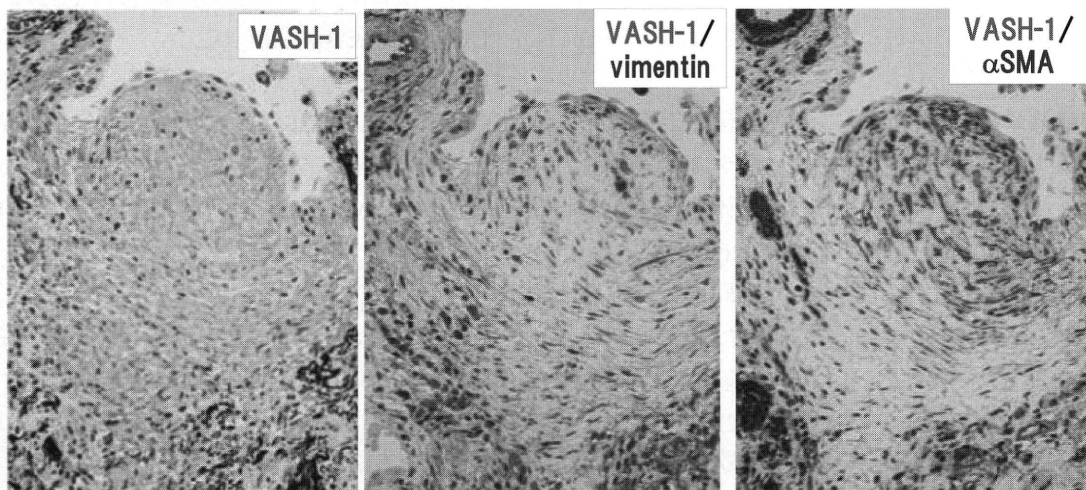


図2：IPF患者肺内線維化病変におけるVASH-1発現  
IPF患者の筋線維芽細胞巣におけるVASH-1の発現は筋線維芽細胞に認める。(X400)

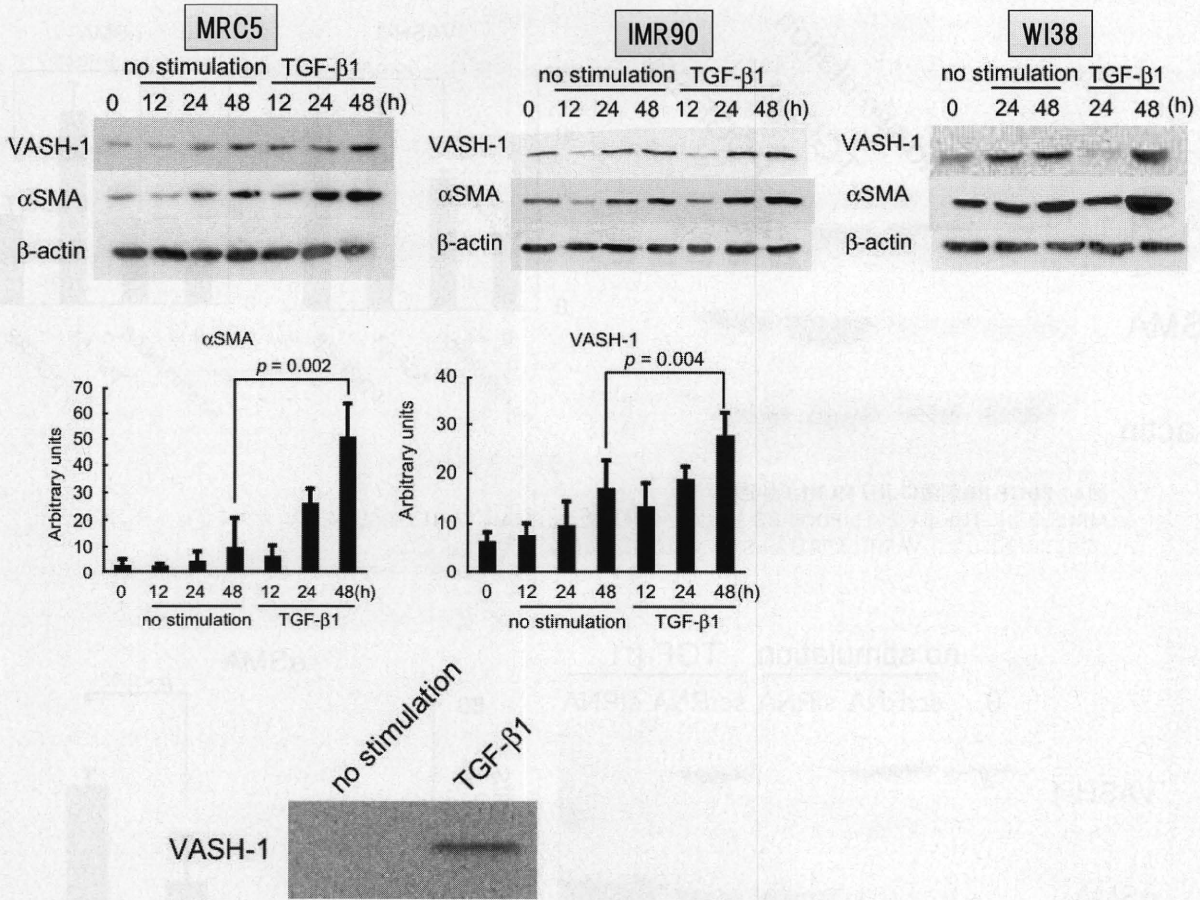


図3：ヒト肺線維芽細胞へのTGF-β1刺激によりVASH-1が誘導。

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

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

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

#### VASH-1ノックダウン細胞における筋線維芽細胞分化の検討

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

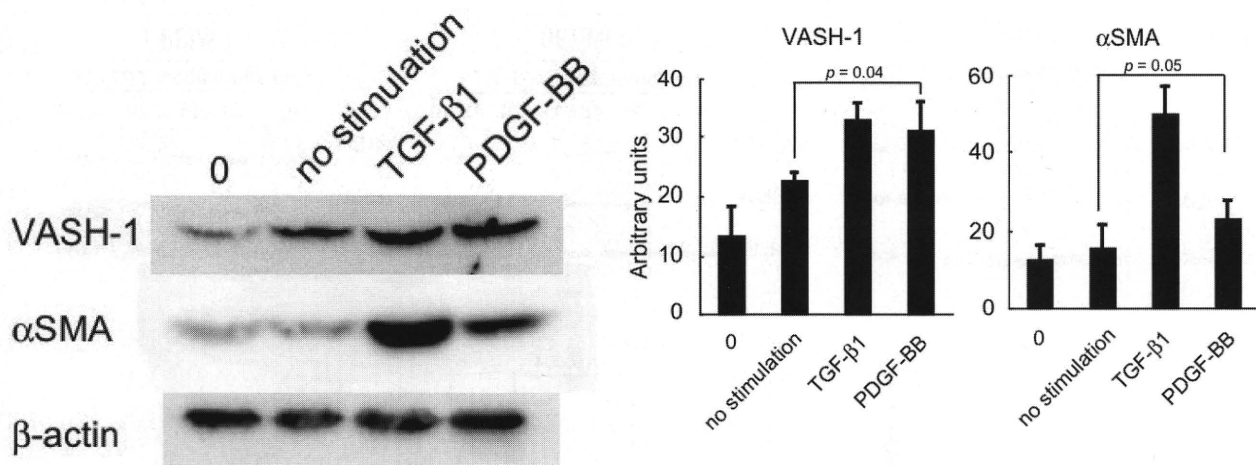


図4：PDGF-BB刺激によりVASH-1が発現。  
MRC5細胞にTGF-β1ないしPDGF-BBを添加後48時間後のαSMA, VASH-1発現量をウエスタンブロッティング法にて検出した。VASH-1発現量とαSMA発現量を定量化しグラフで示した。

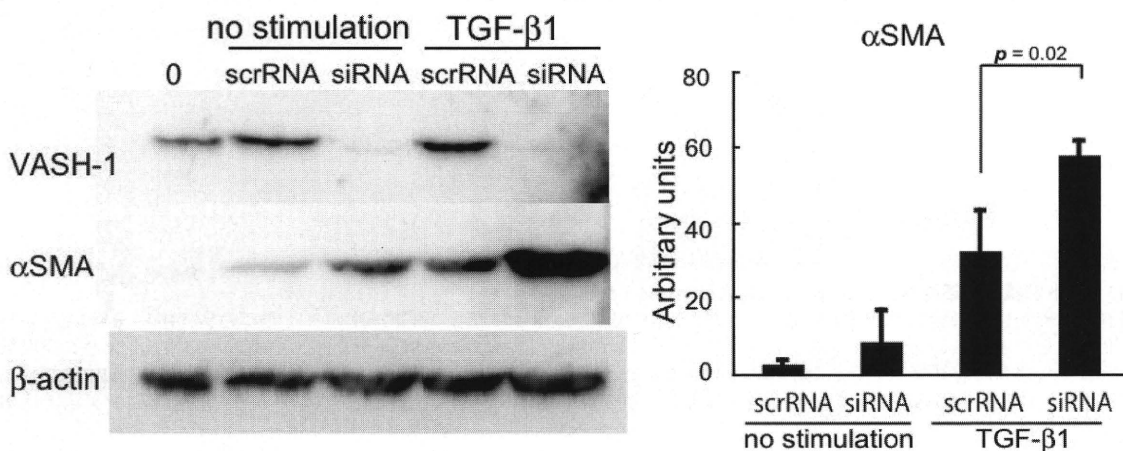


図5：VASH-1ノックダウンによりαSMAの発現が増大。  
MRC5細胞にsiRNAを用いてVASH-1のノックダウンを行った後、24時間後にTGF-β1を添加し、48時間後の細胞中のVASH-1αSMA発現量をウエスタンブロッティング法にて示した。さらにαSMAタンパク量を定量化しグラフで示した。VASH-1 siRNAのコントロールとしてはスクランブル配列を使用した。

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

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

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

### VASH-1ノックダウン+TGFβ1で増減する遺伝子

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

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

#### 結 語

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

#### 文 献

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

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

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

【平成22年度】

## 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.