

筋線維芽細胞における pirfenidone と cyclosporine の 抗線維化作用の併用効果の検討

阿部 恭子¹ 千葉 茂樹¹ 伊藤 貴文² 廣田 直² 久田 修¹
太田 洋充¹ 大河内眞也¹ 貫和 敏博¹ 海老名雅仁^{1*}

(背景) 特発性肺線維症(IPF: Idiopathic pulmonary fibrosis)に対する世界初の抗線維化治療薬である pirfenidone に関してはさまざまな研究がなされているがその作用機序には未だ不明な点も多い。cyclosporine の IPF に対する報告は少ないものの、私たちはこれまでに人胎児肺由来の筋線維芽細胞に対する cyclosporine による直接的な抗線維化作用を示しており、臨床においても cyclosporine を投与して線維化病態が安定する IPF 患者を経験している。さらに両剤を併用することで線維化が安定した患者も経験しており、併用にて効果が高まる可能性があると考えている。

(目的) 筋線維芽細胞における pirfenidone と cyclosporine による抗線維化作用機序を比較し、さらに臨床にて併用することの意義を基礎的に確認する。

(結果) 人胎児肺由来線維芽細胞を TGF- β 1 にて刺激し、筋線維芽細胞に分化することで発現する α -SMA や collagen 産生が pirfenidone にて抑制されることを示した。さらにその際に変化を示す TGF- β 下流遺伝子発現産物に、cyclosporine によるものと異なるものがあることを示した。pirfenidone と cyclosporine を併用することで、それぞれの単独使用よりも低い濃度で高い線維化抑制効果を得ることができた。

(考察) 異なる作用機序の薬剤を併用することで、各々の副作用の発現を抑制しつつ抗線維化効果を高め、なおかつ副作用を軽減できる可能性があると考えられた。

¹ 東北大学大学院 医学系研究科 呼吸器病態学分野

² 東邦大学医療センター 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

背景

Pirfenidone(PFD)は特発性肺線維症(IPF: Idiopathic pulmonary fibrosis)に対して世界で初めて承認された抗線維化剤である。その作用機序として、TGF- β 産生抑制[1]やコラーゲン産生抑制作用などの抗線維化作用[2]、TNF- α 産生抑制[3, 4]などの抗炎症作用、さらに抗酸化作用[5]などが報告されているが、未だにその標的分子は不明であり、明確な作用機序は解明されていない。

Cyclosporine(CsA)はカルシニューリン阻害剤として作用し、転写因子である nuclear factor of activated T-lymphocytes(NF-AT)の脱リン酸化による核内移行を阻害してIL-2などの産生を抑制することで強力な免疫抑制作用を発揮する薬剤として広く知られている。IPFに関しては大規模臨床試験などは行われておらず、IPF患者やIPFの急性増悪後の予後を改善したという少人数での報告[6-8]がなされている程度である。肺の線維化に対する基礎的なデータも乏しいが、我々はこれまでにヒト胎児肺由来線維芽細胞にてCsAが線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を抑制することをすでに示しており、CsAが肺に対する抗線維化作用を有することが示唆されている。

IPFの線維化病態において重要な役割を果たしている筋線維芽細胞は、主としてTGF- β 1の刺激を受けて線維芽細胞から分化誘導され、平滑筋細胞とともに α SMA(alpha-smooth muscle actin)を発現することが知られている[9]。我々はin vitroにてPFDがこの分化誘導を抑制することで抗線維化作用を示すかを調査し、さらにCsAとの併用で効果が増強するかを検討した。

方法

培養細胞：ヒト胎児肺由来線維芽細胞株MRC-5を37°C 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。ディッシュに細胞を播種し24時間後に無血清培地に交換、その24時間後にCsA単独、PFD単独またはPFDとCsAの両剤を添加し、さらにその1時間後にTGF- β 1(5ng/ml)を添加し、その後48時間培養した。

定量RT-PCR：RNeasy mini kit(QIAGEN社)を用いてtotal RNAを精製し、High capacity RNA-to-cDNA Kit(Applied Biosystems社)にて逆転写を行った。定

量RT-PCRはStep One Plus™ (Applied Biosystems社)にて行った。全てのデータはハウスキーピング遺伝子であるGAPDHにて補正した。

TGF- β 関連遺伝子変化の検討：TaqMan® Array 96-Well plate human TGF β Pathway(Applied Biosystems社)を用いて行った。解析はTGF- β のみを添加したものを1として、2倍以上の差があるものを有意と考えた。

結果

pirfenidone および cyclosporine の抗線維化作用

PFDとCsAをMRC5に48時間作用させた時の α SMAとTGF I型コラーゲンのmRNAの発現を評価した。TGF- β 1にて誘導される線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化は、PFD50 μ g/mlから濃度依存性に抑制され、200 μ g/mlにて有意に抑制された($p < 0.0001$)(図1)。また、PFDにてI型コラーゲンの産生も濃度依存性に抑制され、それはPFD200 μ g/mlにて有意に抑制された($p = 0.024$)(図1)。同様にCsAにて α SMAのmRNAの発現は濃度依存性に抑制され、2 μ g/mlで有意差がみられた($p = 0.035$)(図2)。

pirfenidone と cyclosporine の併用による抗線維化効果

PFDとCsAを単独で作用させた場合では有意差は見られないものの抑制効果がみられた濃度であるPFD100 μ g/mlとCsA1 μ g/mlの併用にて抗線維化効果が増強するかを検討した。定量RT-PCRにて単独投与でも α SMAの抑制が見られるものの、両剤を併用した群にてさらに α SMAの発現は抑制され(PFD100 μ g/ml vs PFD100 μ g/ml + CsA1 μ g/ml; $p < 0.0001$, CsA1 μ g/ml vs PFD100 μ g/ml + CsA1 μ g/ml; $p < 0.0001$)、併用にて筋線維芽細胞における抗線維化効果が高まることが示唆された(図3)。

pirfenidone と cyclosporine の抗線維化作用機序の比較

PFDとCsAのそれぞれが筋線維芽細胞に対する抗線維化作用を有することがわかったため、次にその作用機序を比較する目的でTGF- β 関連遺伝子発現を調べた。検体としては①TGF- β 1(3ng/ml)、②TGF- β 1(3ng/ml)+PFD(200 μ g/ml)、③TGF- β 1(3ng/ml)+CsA(2 μ g/ml)を48時間作用させた細胞で比較した。n=1のデータではあるが、PFDのみで発現が上昇する遺伝子(SMAD6, SMAD9, TSC22D1)、低下する遺伝子(BMPRI1B)、またCsAのみで発現が上昇する遺伝

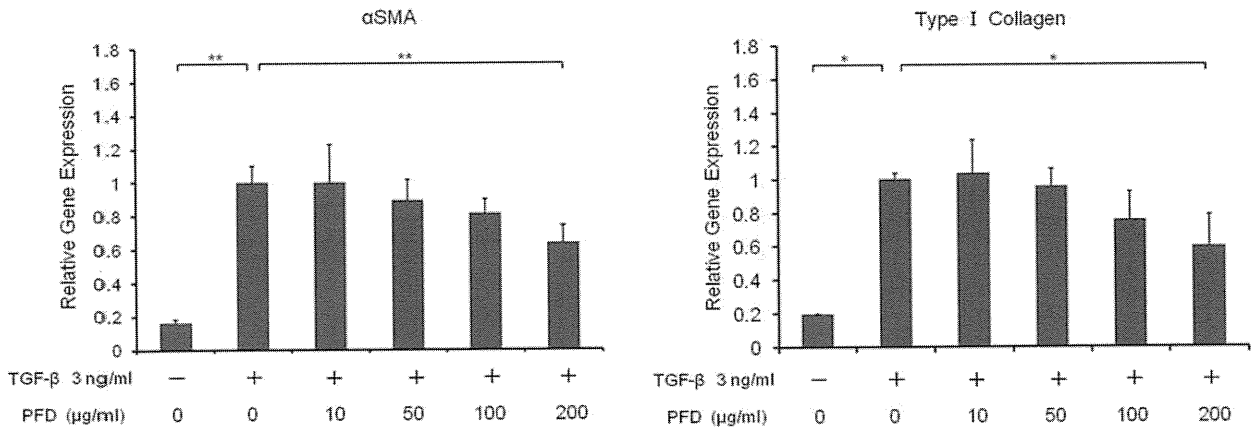


図1 PFDの線維芽細胞に対する抗線維化作用
 (左) MRC5にTGF-β1とPFDを48時間作用させた時のαSMAのmRNAの発現(n=7)
 (右) MRC5にTGF-β1とPFDを48時間作用させた時のI型コラーゲンのmRNAの発現(n=3)
 *P<0.05, **P<0.01

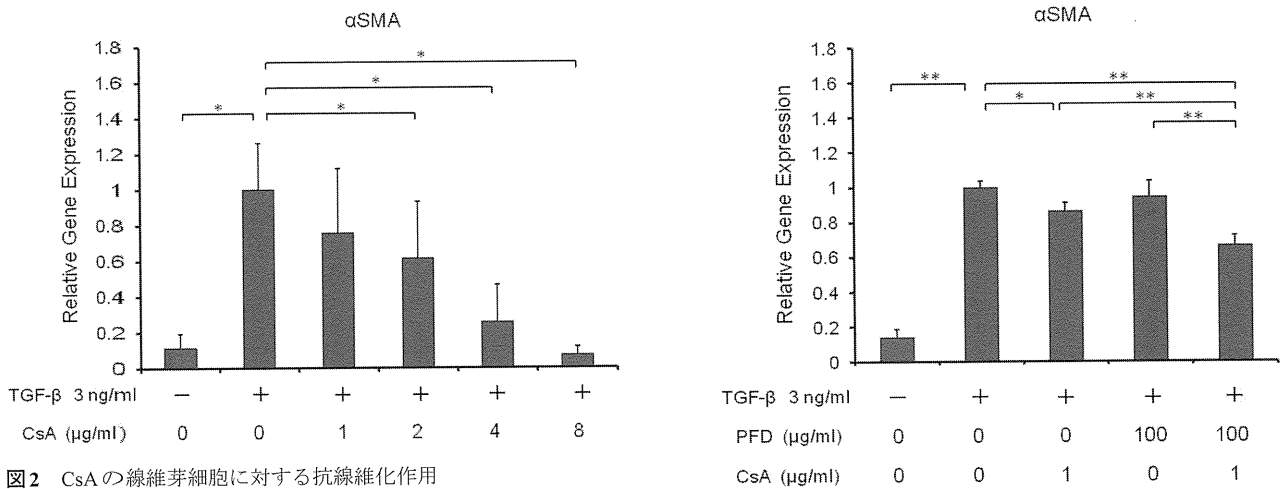


図2 CsAの線維芽細胞に対する抗線維化作用
 MRC5にTGF-β1とCsAを48時間作用させた時のαSMAのmRNAの発現(n=3)
 *P<0.05

図3 PFDとCsAの併用効果
 MRC5にTGF-β1を作用させ、さらにPFD単独、CsA単独またはPFD+CsAを48時間作用させた時のαSMAのmRNAの発現(n=4)
 *P<0.05

子(GDF15, FST), 低下する遺伝子(BMP2, TGFβ3)が見られた。(表1)

考 察

PFDの抗線維化作用に関して、in vitroではヒト胎児肺由来線維芽細胞株WI-38での線維芽細胞増殖抑制やコラーゲン産生抑制や、ヒト単球THP-1細胞でのTGF-β1産生抑制作用などが示されてきた。今回我々は、ヒト胎児肺由来細胞株MRC5において、TGF-β1にて誘導される線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化がPFDによって直接的に抑制されることを示した。また、PFDはI型コラーゲンのmRNAの発現を抑制することも示された。CsAも同様に線

維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を抑制した。これらのことより、PFDとCsAは線維芽細胞に対しての抗線維化作用を有することが示唆された。

TGF-β1にて誘導される線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化をどのような機序で抑制しているのかを調べるために、TGF-βと関連する遺伝子発現の変化を調べたところ、両剤で異なる遺伝子発現の変化がみられた。n=1のデータであるので、今後のさらなる検討が必要ではあるが、PFDとCsAが異なる機序で線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を抑制している可能性が考えられる結果であった。

以上より、in vitroにてPFDとCsAはそれぞれに

表1 PFD, CsAにて変化するTGF- β 関連遺伝子
MRC5に①TGF- β 1(3ng/ml), ②TGF- β 1(3ng/ml)+PFD(200 μ g/ml), ③TGF- β 1(3ng/ml)+CsA(2 μ g/ml)を48時間作用させ、それぞれのTGF- β 関連遺伝子発現の変化を比較(n=1)

| | Gene Symbol | Description | Fold change (vs TGF) | |
|-------------------|-------------|--|----------------------|------|
| | | | PFD | CsA |
| PFD,CsAの両方で 上昇 | TGFBR3 | transforming growth factor,beta receptor III | 4.92 | 3.69 |
| | RBL1 | retinoblastoma-like 1 (p107) | 3.37 | 2.08 |
| | IL6 | interleukin 6 (interferon, beta 2) | 2.00 | 2.03 |
| | ACVR2A | acvtivin A receptor, type IIA | 2.82 | 2.23 |
| PFDで上昇 | SMAD9 | SMAD family member 9 | 2.91 | 1.62 |
| | SMAD6 | SMAD family member 6 | 2.01 | 1.04 |
| | TSC22D1 | TSC22 domain family member 1 | 2.31 | 0.93 |
| PFDで低下 | BMPR1B | bone morphogenetic protein receptor, type IB | 0.44 | 1.50 |
| CsAで上昇 | GDF15 | growth differentiation factor 15 | 1.14 | 2.52 |
| | FST | folistatin | 0.76 | 2.50 |
| CsAで低下 | TGFB3 | transforming growth factor,beta III | 0.59 | 0.34 |
| | BMPR2 | bone morphogenetic protein receptor, type II | 1.16 | 0.49 |

線維芽細胞に対する抗線維化作用を有し、さらにその作用機序が異なることが示唆され、併用にて抗線維化作用が高まった。臨床的にも異なる作用機序の両剤を併用することで、より低用量での効果と副作用の軽減につながることが期待できる。

引用論文

- 1) Oku, H., et al., *Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis*. Eur J Pharmacol, 2008. **590**(1-3): p. 400-8.
- 2) Nakayama, S., et al., *Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF- β 1-stimulated human lung fibroblasts*. Life Sciences, 2008. **82**(3-4): p. 210-217.
- 3) Grattendick, K.J., et al., *Effects of three anti-TNF- α drugs: etanercept, infliximab and pirfenidone on release of TNF- α in medium and TNF- α associated with the cell in vitro*. Int Immunopharmacol, 2008. **8**(5): p. 679-87.
- 4) Oku, H., et al., *Pirfenidone suppresses tumor necrosis factor- α , enhances interleukin-10 and protects mice from endotoxic shock*. Eur J Pharmacol, 2002. **446**(1-3): p. 167-76.
- 5) Misra, H.P. and C. Rabideau, *Pirfenidone inhibits NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation and scavenges hydroxyl radicals*. Mol Cell Biochem, 2000. **204**(1-2): p. 119-26.
- 6) Homma, S., et al., *Cyclosporin treatment in steroid-resistant and acutely exacerbated interstitial pneumonia*. Intern Med, 2005. **44**(11): p. 1144-50.
- 7) Lok, S.S., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis and cyclosporine: a lesson from single-lung transplantation*. Chest, 1998. **114**(5): p. 1478-81.
- 8) Sakamoto, S., et al., *Cyclosporin A in the treatment of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis*. Intern Med, 2010. **49**(2): p. 109-15.
- 9) Roy, S.G., Y. Nozaki, and S.H. Phan, *Regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(7): p. 723-34.

in vitro での Liver X Receptor (LXR) アゴニストの 抗線維化作用

久田 修 千葉 茂樹 阿部 恭子 太田 洋充 大河内眞也 海老名雅仁*

Liver X Receptors (LXRs)は、酸化コレステロールを生体内リガンドとする核内受容体であり、近年、代謝調節に加えて抗炎症調節に関与する事が示されている。LXR- α と類似した組織内分布を示すPeroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- γ は、抗炎症に加えて、その抗線維化作用が注目されており、PPAR- γ とLXR- α の相違点の解明は、新たな治療法開発につながる可能性がある。そこで本年度は、ヒト胎児肺線維芽細胞株(MRC-5)を用いて、*in vitro*でのLXRアゴニストの抗線維化作用につき検討した。

合成LXRアゴニストT0901317、生理的LXRアゴニスト22(R)-hydroxycholesterolの付加は、TGF- β による線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を抑制した。この時、SMAD2、SMAD3のリン酸化は抑制しなかった。また、不可逆的PPAR- γ アンタゴニストGW9662の付加は、この抑制効果に影響を与えなかった。以上の結果から、*in vitro*で、LXRアゴニストは、SMAD、PPAR- γ を介さない経路で抗線維化作用を示す事が示された。

研究目的

特発性肺線維症などの進行性肺線維症や難治性喘息における気道周囲の線維化は、グルココルチコイドに対する反応が不良であり、新たな治療戦略が望まれている。

核内受容体を組織の発現レベルからクラスター化すると、グルココルチコイド受容体(Glucocorticoid Receptor : GR)は、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) - γ 、Liver X Receptor (LXR)- α と1つのグループを形成する。このグループは、エネルギー代謝に加えて、抗炎症作用を有するという共通した特性を持つ。Toll様受容体シグナルに対するGR、PPAR γ 、LXRの転写調節を調べた報告では、3者とも共通した遺伝子群を制御する一方、異なる遺伝子群が変化する事が示されている[1]。さらに、線維化制御という観点では、PPAR- γ が抗炎症作用とは別に抗線維化作用を持つ事が示されており、新たな治療標的として注目されている[2, 3]。一方、LXR- α の線維化病態における役割は不明である。

GR、PPAR γ 、LXR- α の相違点を明らかにする事は、核内受容体の線維化病態への関与の解明につながる可能性がある。そこで、本年度は、LXR- α の線維化調節機構を解明すべく、*in vitro*でLXRアゴニストの抗線維化作用を検討した。

研究方法

ヒト胎児肺線維芽細胞MRC5に、2ng/mlのTGF- β を48時間作用させ筋線維芽細胞に分化をさせた。この時に、TGF- β の添加の30分前に、合成LXRアゴニストT0901317、生理的LXRアゴニスト22(R)-hydroxycholesterol、不可逆的PPAR- γ アンタゴニストGW9662等を加え、Real-time PCR、Western blotting、コラーゲン定量を用いて、筋線維芽細胞への分化抑制、細胞外基質に与える影響、細胞内シグナル伝達系への影響を解析した。

研究結果

(1)、LXRアゴニストによる抗線維化作用

1 ~ 10 μ M のLXRアゴニストT0901317は、TGF- β による α -SMAの誘導を、用量依存性に抑制した(図

1A)。また、10 μ MのT0901317は、 α -SMAに加えて、Type1 Collagen、Type3 Collagen、Fibronectinなどの細胞外基質、CTGFのmRNAの発現を減少した。一方、PAI-1、TIMP-1の発現は増加した。また、核内受容体 LXR- α 、PPAR- γ の発現は、TGF- β の添加により減少するが、T0901317の添加により回復をした(図1B)。さらに、培養上清のコラーゲン量は、T0901317の添加により減少をした(図1C)。

次に、生理的アゴニストの1つである22(R)-hydroxycholesterolの抗線維化作用を検討した。合成アゴニストと同様に、2.5 ~ 10 μ Mの22(R)-hydroxycholesterolは、TGF- β による α -SMAの誘導を、用量依存性に抑制した(図2)

(2)、PPAR- γ 非依存的なLXRアゴニストの抗線維化作用

次に、LXRアゴニストはPPAR γ の発現を増加する事から、LXRアゴニストの抗線維化作用におけるPPAR- γ の関与について検討した。図3に示すように、不可逆的PPAR- γ アンタゴニストGW9662は、T0901317による-SMA発現抑制に影響を与えなかった(図3)。この事からLXRアゴニストは、PPAR- γ 非依存的に抗線維化作用を示すと考えられた。

(3)、SMAD非依存的なLXRアゴニストの抗線維化作用

最後に、LXRアゴニストがTGF- β /SMAD系に与える影響を検討した。T0901317は、SMAD2、SMAD3のリン酸化、および核への移行に影響を与えなかった(図4)。この事から、LXRアゴニストの抗線維化作用は、SMAD非依存的であると考えられた。

考察

我々は、*in vitro*で、LXRアゴニストが抗線維化作用を有する事を示した。合成LXRアゴニストT0901317、生理的LXRアゴニスト22(R)-hydroxycholesterolは、筋線維芽細胞への分化を抑制し、細胞外基質やCTGFの発現を減少した。

LXRは、生体内では酸化コレステロールを生理的リガンドとする核内受容体で、細胞内コレステロールの逆輸送、小腸でのコレステロール吸収抑制、肝での脂肪酸合成などに関与する[4]。LXRの標的蛋白の1つであるSREBP-1は、LXRアゴニスト 1

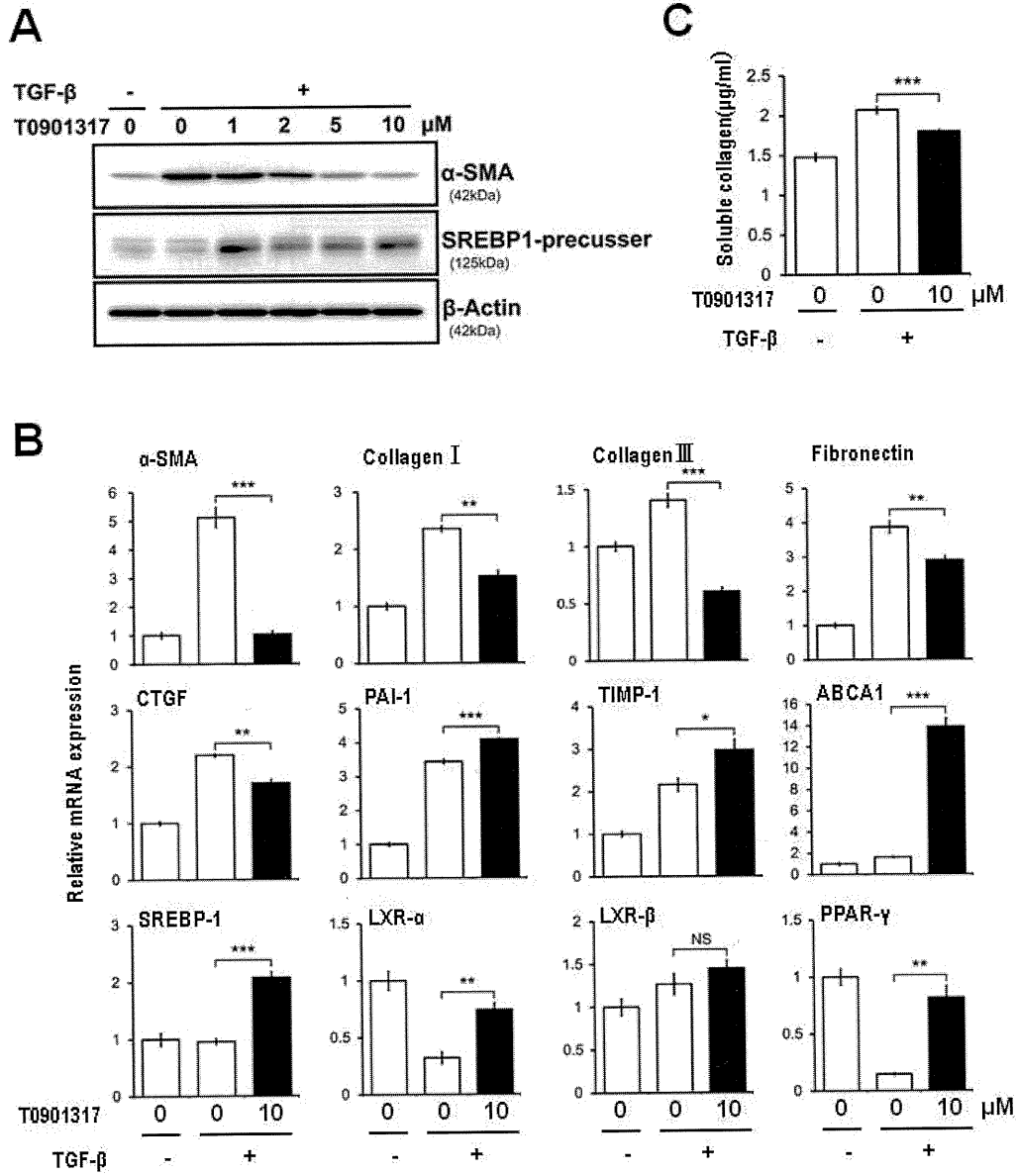


図1 合成LXRアゴニストT0901317による抗線維化作用
 A. MRC5に、2ng/mlのTGF-βと0～10μMのT0901317を加え48時間反応させ、α-SMAをWestern blottingにより定量した。
 B. Real-time PCR法によるmRNAの発現量. C. 培養上清中の水溶性コラーゲン量.

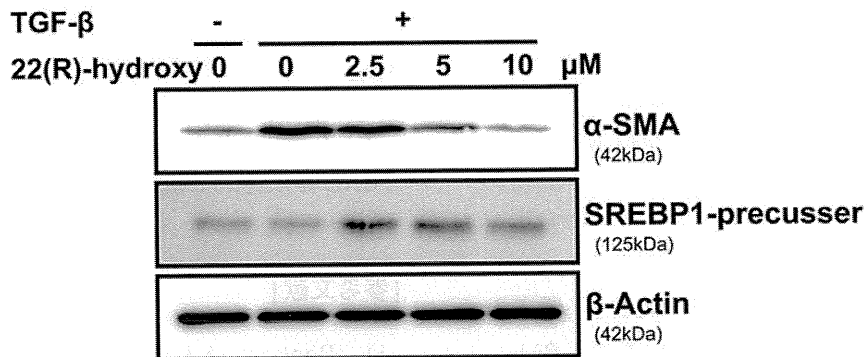


図2 生理的LXRアゴニスト22(R)-hydroxycholesterolによる抗線維化作用
 MRC5に、2ng/mlのTGF-βと0～10μMの22(R)-hydroxycholesterolを加え48時間反応させ、α-SMAをWestern blottingにより定量した。

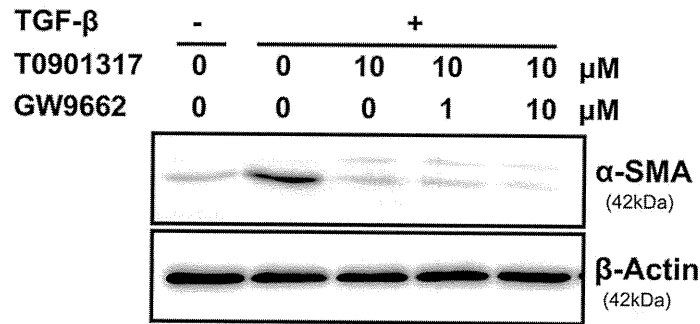


図3 PPAR- γ 非依存的なLXRアゴニストの抗線維化作用
MRC5に、TGF- β とT0901317に加えて不可逆的PPAR- γ アンタゴニストGW9662を添加して48時間反応させ、 α -SMAをWestern blottingにより定量した。

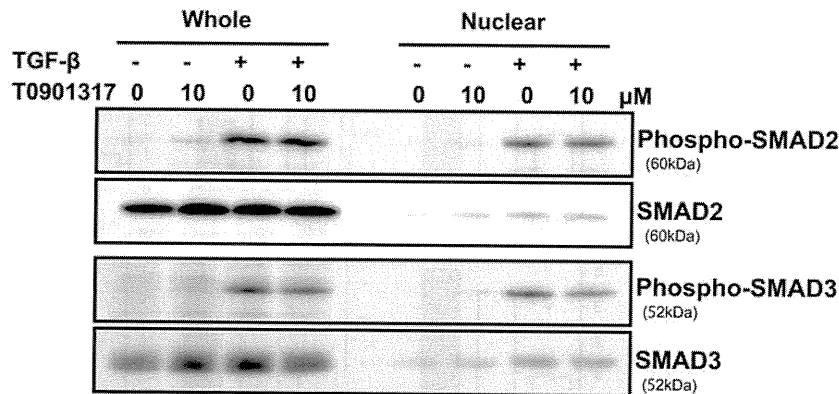


図4 SMAD非依存的なLXRアゴニストの抗線維化作用
MRC5に、2ng/mlのTGF- β と10 μ MのT0901317を加え30分間反応させ、全細胞、核分画でのSMAD2、SMAD3のリン酸化をWestern blottingにより定量した。

μ M(2.5 μ M)と10 μ Mで誘導が変わらないのに対して、 α -SMAは10 μ Mで優位に抑制された(図1A, 2)。この結果から、筋線維芽細胞への分化抑制と脂質代謝関連因子の誘導の効果濃度は異なっており、脂質代謝関連因子とは独立した経路で抗線維化作用を示す事が想定された。

PPAR- γ の抗線維化作用に関しては、PPAR- γ 依存的[5]、非依存的とする報告[6]、SMAD依存的[7]、非依存的とする報告[8]があり、詳しい分子メカニズムは分かっていない。今回、我々は、LXRアゴニストの抗線維化作用は、PPAR- γ 非依存的、SMAD非依存的である事を示した。PPAR- γ アゴニストとLXRアゴニストの抗線維化作用が、同様のメカニズムを介しているかどうかは、今後の解析が必要である。

本研究では、LXRアゴニストが細胞外基質の発現を抑制する事を示したが、一方で、PAI-1、TIMP-1の発現が増加した。PAI-1[9]、TIMP-1[10]は、肺線維化病態においては促進的に働く事が報告され

ている。この事から、*in vivo*での抗線維化作用に関しては、ブレオマイシン肺障害モデルなどを使った検討が必要である。

今回我々は、*in vitro*でのLXRアゴニストの抗線維化作用を明らかにした。*in vivo*での更なる解析が必要とされるが、LXRの治療標的としての可能性に加えて、脂質代謝と肺線維化との接点になる可能性が示された。

結論

LXRアゴニストは、*in vitro*で、PPAR- γ 非依存的、SMAD非依存的に抗線維化作用を示した。

[参考文献]

- 1) Bookout, A.L., et al., Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. Cell, 2006. 126(4): p. 789-99.

- 2) Burgess, H.A., et al., PPARgamma agonists inhibit TGF-beta induced pulmonary myofibroblast differentiation and collagen production: implications for therapy of lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. 288(6): p. L1146-53.
- 3) Milam, J.E., et al., PPAR-gamma agonists inhibit profibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. 294(5): p. L891-901.
- 4) Viennois, E., et al., Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health? *Mol Cell Endocrinol*, 2011.
- 5) Honda, K., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 113(5): p. 882-8.
- 6) Kulkarni, A.A., et al., PPAR-gamma Ligands repress TGFbeta-induced myofibroblast differentiation by targeting the PI3K/Akt pathway: implications for therapy of fibrosis. *PLoS One*, 2011. 6(1): p. e15909.
- 7) Zhao, C., et al., PPARgamma agonists prevent TGFbeta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 350(2): p. 385-91.
- 8) Ghosh, A.K., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator. *FASEB J*, 2009. 23(9): p. 2968-77.
- 9) Senoo, T., et al., Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax*, 2010. 65(4): p. 334-40.
- 10) Selman, M., et al., TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. 279(3): p. L562-74.

肺線維症におけるオートファジーの役割

荒屋 潤 原 弘道 伊藤 三郎 藤井さと子 高坂 直樹
小島 淳 鶴重千加子 弓野 陽子 清水健一郎 石川 威夫
沼田 尊功 河石 真 斉藤 桂介 中山 勝敏 桑野 和善*

加齢は特発性肺線維症(IPF)の重要な危険因子であり、我々は、IPFにおいて肺上皮細胞の老化が亢進し、その病態に関与している可能性を報告してきた。オートファジーは、リソソームを介した細胞内の蛋白分解機構であり、生理的役割だけでなく、傷害時の細胞内環境維持、細胞老化など、様々な病態においても重要である。今回、IPF病態へのオートファジーの関与を、患者肺組織を用いて免疫組織学的に検討した。オートファジー活性はp62とユビキチン化蛋白の蓄積、LC3及びBeclin1の発現により、また細胞老化は老化関連サイクリン依存性キナーゼであるp21の発現により評価した。p62とユビキチン化蛋白は線維化進展部位における化生上皮細胞に高発現し、これらの細胞ではp21の発現も認めた。一方完成した線維化である蜂窩肺領域では、p62とユビキチン化蛋白及びp21の発現細胞はわずかに認めるのみであった。正常構造を保った領域におけるII型肺胞上皮細胞ではp62とユビキチン化蛋白の蓄積を認めたが、p21の発現は認めず、オートファジー亢進を示唆するLC3の高発現を認めた。以上より、オートファジーによる細胞内傷害たんぱく分解除去と老化との関連性が示唆され、さらに細胞老化がIPF病態における線維化進展に、積極的に関与している可能性が考えられた。

Cellular senescence with insufficient autophagy of metaplastic epithelial cells in IPF

Jun Araya, Hiromichi Hara, Saburo Ito, Satoko Fujii, Naoki Takasaka,
Jun Kojima, Chikako Tsurushige, Yoko Yumino, Kenichiro Shimizu, Takeo Ishikawa,
Takanori Numata, Makoto Kawaiishi, Keisuke Saito, Katsutoshi Nakayama, and Kazuyoshi Kuwano.

Division of Respiratory medicine, The Jikei University School of Medicine

Accelerated cell senescence has been implicated in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Autophagy plays an important regulatory role in cell senescence through degradation of damaged cellular components. To determine if insufficient autophagy is involved in cellular senescence of epithelial cells in IPF. We examined the autophagy status by means of immunohistochemical evaluation of p62, ubiquitin, LC3, and beclin1 in lung. We demonstrated that metaplastic epithelial cells in IPF expressed both ubiquitinated proteins and p62. p21 expression was also observed in metaplastic epithelial cells. Type II alveolar epithelial cells (AECII) in relatively normal areas of IPF were also stressed by means of ubiquitin staining, however concomitant microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) expressions, indicating autophagy activation, may explain why p21 expression was not observed in those cells. These findings suggest that insufficient autophagy is a potent underlying pathology of accelerated cellular senescence and a promising clue to understanding the molecular mechanisms of the senescence associated lung disease, IPF.

(はじめに)

特発性肺線維症(IPF)は加齢とともにその頻度が増加する老化関連肺疾患である¹⁾。近年IPFの病態とreplicative cell senescenceを規定するテロメア機能との関連性が報告されている²⁾³⁾。我々はIPF肺組織における上皮細胞の細胞老化亢進を、代表的な細胞老化の指標であるsenescence associated(SA) β -galactosidase (gal)染色とp21の発現により明らかにし、さらにこの細胞老化亢進が、senescence associated secretory phenotype(SASP)としてのサイトカイン産生の亢進によりIPF病態に関与している可能性も明らかにした⁴⁾。しかしながら、この細胞老化制御の機序は十分に解明されていない。

オートファジーとは、細胞内自己成分の分解処理機構である。オートファゴソームと呼ばれるリン脂質の2重膜様構造からなる小胞によりタンパク質や細胞小器官を囲い込み、リソソームに移送し融解・分解する。オートファジーは、生理的なアミノ酸供給だけでなく、細胞内環境維持、免疫応答、感染症制御、発癌抑制、プログラム細胞死、様々な病態においても重要である⁵⁾。オートファジーが、細胞内に蓄積する異常な蛋白質や小器官の除去において中心的な役割を果たす点から、細胞老化制御における重要性も注目されている。またIPF組織の上皮細胞において小胞体ストレスの亢進が報告されているが、この小胞体ストレスも適応反応としてオートファジーを誘導すると考えられている⁶⁾。

喫煙はIPF進展の危険因子であり、上皮細胞老化を誘導する事が報告されている^{7,8)}。我々は喫煙刺激によるオートファジー誘導が一過性であり、その後オートファジーが不十分であるためp62及びユビキチン化蛋白質が蓄積し、同時に気道上皮細胞老化を誘導することを見出した(投稿中)。つまり喫煙、細胞老化の関連する呼吸器疾患であるIPF病態に、オートファジーが関与する可能性は十分にあるが、IPFにおけるオートファジーの役割に関しては、これまで検討されていない。今回我々はIPF病態へのオートファジーの関与を明らかにする目的で、患者肺組織を使用し免疫組織学的な検討を行った。

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

(対象と方法)

IPF合併肺癌患者の手術検体から、胸膜直下でUIPパターンを呈する病変部位のパラフィンブロックを使用した(5例)。また正常コントロールとしてIPF非合併肺癌患者からの手術検体を使用した(5例)。いずれも肺癌病変が存在しないことは、病理学的検索により確認した。コントロールとIPF患者間での年齢、呼吸機能、血液ガスに関して有意差を認めず、Brinkman indexのみIPF患者で有意に高値を示した。

オートファジーはオートファジー関連蛋白である、抗microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)抗体、抗Beclin1抗体を用いた免疫組織染色により検討した。また抗p62抗体及び抗ユビキチン抗体を用いた免疫組織染色もオートファジー機能の指標とした。

細胞老化は、老化関連cyclin-dependent kinase inhibitorであるp21に対する染色により評価した。

免疫組織染色は、正常肺実質、正常気道、早期線維化巣、軽度から中等度線維化部位、蜂窩肺部位で上皮細胞と線維芽細胞に分けて評価した。400倍で、それぞれの部位を5視野撮影し、全体と染色陽性細胞数をカウントし、平均陽性パーセントを；0(10%以下)、1(11~49%)、そして2(50%以上)として半定量的に評価した。

(結 果)**1. オートファジー関連蛋白 LC3と Beclin1 発現**

IPF肺組織では、ほぼ正常構造と思われる領域のII型肺胞上皮において、ドット状にLC3発現亢進を認めた。IPF肺組織の他の部位及び正常肺組織ではLC3発現亢進を認めなかった(図1 A, B)。一方Beclin1はIPFと正常の両肺組織でびまん性に高度に染色された。しかしながらIPF肺組織の構造的に正常と思われる領域のII型肺胞上皮においてはやや強い染色性を認めた(図1 C, D)。

2. p62とユビキチン発現

近年ユビキチン化された細胞内小器官や蛋白凝集体が、アダプター蛋白であるp62を介して、オートファジーで選択的に分解されることが報告された。

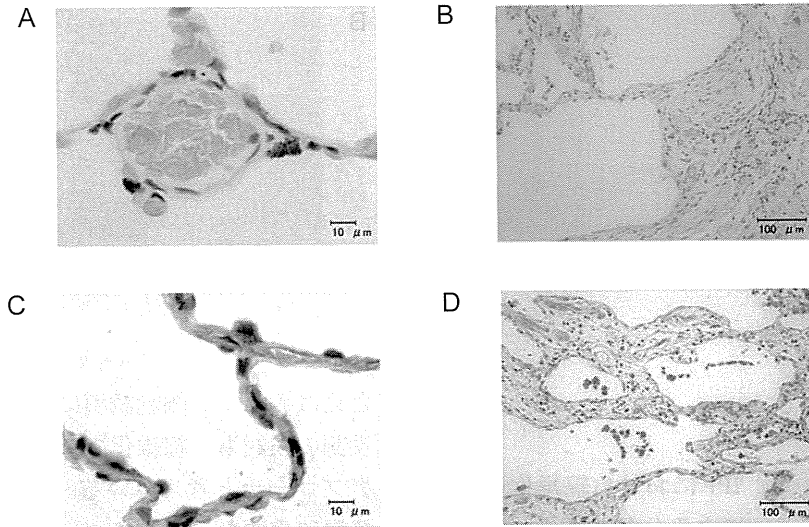


図1. オートファジー関連蛋白発現
 抗LC3抗体染色：A 正常構造領域 (IPF) B 軽度から中等度線維化部位 (IPF)
 抗Beclin1抗体染色：C 正常構造領域 (IPF) D 軽度から中等度線維化部位 (IPF)

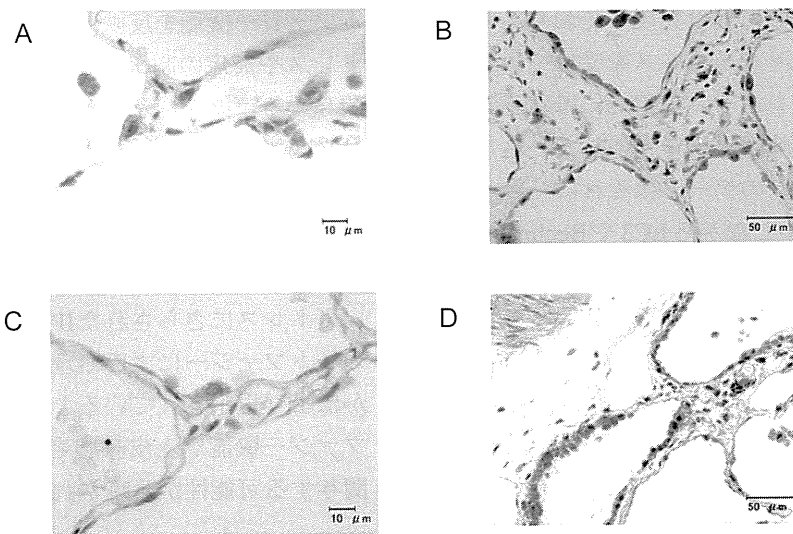


図2. p62とubiquitin発現
 抗p62抗体染色：A 正常構造領域 (IPF) B 軽度から中等度線維化部位 (IPF)
 抗ubiquitin抗体染色：C 正常構造領域 (IPF) D 軽度から中等度線維化部位 (IPF)

つまりユビキチン化蛋白とp62が同時に蓄積することは、オートファジーによる分解が不十分である指標の一つと考えられている⁹⁾。IPF肺組織では、ほぼ構造正常と思われる領域のII型肺胞上皮細胞において、p62とユビキチン化蛋白が発現していた。一方正常肺組織のII型肺胞上皮細胞ではp62の発現を認めたがユビキチン化蛋白の発現は認めなかった。IPF肺組織では早期から中等度の線維化進展部位では上皮細胞と上皮化線維芽細胞の両方でp62とユビキチン化蛋白の高発現を認めた。一方、高度に線維化進展した蜂窩肺の部位では上皮細胞と線維芽細胞

ともに陽性細胞をわずかに認めるのみであった(図2 A, B, C, D)。

3. IPFにおけるp21発現

細胞老化の指標の一つであるp21は、早期から中等度の線維化進展部位の上皮細胞でのみ高度に発現を認めた。つまりオートファジー関連蛋白発現が亢進しておらず、かつp62とユビキチン化蛋白が高発現し、オートファジーが不十分と考えられる上皮細胞で細胞老化が亢進していた(図3 A, B)。

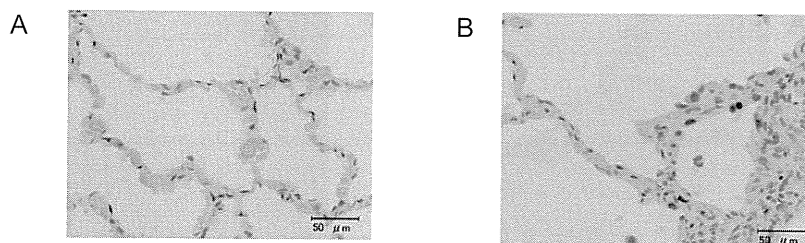


図3. p21 発現
抗p21抗体染色：正常構造領域 (IPF) B 軽度から中等度線維化部位 (IPF)

(考 察)

今回の我々の検討から、IPFにおける線維化進展部位では、オートファジーによる分解が不十分であり、細胞老化亢進に関与している可能性が示唆された。興味深いことにIPF肺組織の、構造的にはほぼ正常と考えられる領域のII型肺胞上皮でも、p62とユビキチン化蛋白がともに軽度発現しており、おそらくこれらの細胞も様々なストレスを受けていると思われた。小胞体ストレスも、構造的にほぼ正常と考えられる領域のII型肺胞上皮で亢進していることが報告されており、我々のデータはそれに一致する所見と思われた⁹⁾。しかしながらLC3やBeclin1の高発現からは、オートファジーが代償的に亢進しており、そのためp21発現でみる細胞老化が誘導されていないと推測した。

今回の検討でp21発現を強く認めたのは、主に線維化進展部位であり、蜂窩肺を呈する完成した線維化部位では逆にその発現が低下していた。p21はオートファジーが不十分である部位とほぼ一致して発現しており、オートファジーにより制御される細胞老化が、線維化進展に積極的に関与することを示唆する所見と考えられた。p21は化生上皮細胞に高発現していたが、これまで化生上皮細胞は、サイトカイン産生により線維化進展に関与すると報告されている¹⁰⁾。我々は老化した化生上皮細胞がSASPにより、線維芽細胞を含む周囲微小環境に影響を及ぼし、線維化を誘導しているのではないかと考えている。

線維化進展部位での線維芽細胞においてもp62とユビキチン化蛋白が発現していたが、細胞老化は誘導されていなかった。これは細胞老化誘導に関するオートファジーの役割が細胞種により異なる可能性や、IPFの筋線維芽細胞が細胞老化抵抗性である可能性を示唆する。細胞老化以外の細胞病態制御、た

例えば筋線維芽細胞誘導におけるオートファジーの役割の検討も、線維化の機序解明からは今後必要なアプローチと考えている。またp62は、抗酸化蛋白発現に重要なnuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf-2) や、種々の炎症性サイトカイン産生の中心的転写因子であるNF- κ Bの活性化に関与することが報告されている。つまり高発現したp62が単にオートファジー機能を反映しているだけでなく、酸化ストレスや炎症の制御など様々な側面からIPF病態に関与する可能性を示唆しており、今後さらなる検討が必要である。

(結 論)

ストレスにさらされたIPF上皮細胞の細胞運命が、オートファジーによる処理機能が十分であるかどうかにより規定されていると考えられ、つまりオートファジー機能が上皮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) Ganesh Raghu HRC, Jim J. Egan, Fernando J. Martinez, Juergen Behr, Kevin K. Brown, Thomas V. Colby, Jean-François Cordier, Kevin R. Flaherty, Joseph A. Lasky, David A. Lynch, Jay H. Ryu, Jeffrey J. Swigris, Athol U. Wells, Julio Ancochea, Demosthenes Bouros, Carlos Carvalho, Ulrich Costabel, Masahito Ebina, David M. Hansell, Takeshi Johkoh, Dong Soon Kim, Talmadge E. King, Jr., Yasuhiro Kondoh, Jeffrey Myers, Nestor L. Müller, Andrew G. Nicholson, Luca Richeldi, Moisés Selman, Rosalind F. Dudden, Barbara S. Griss, Shandra L. Protzko, Holger J. Schünemann on behalf of the ATS/

- ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management., *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:788-824.
- 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*. 2011; 300(3):L391-401.
- 5) He C KD. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; 43:67-93.
- 6) Korfei, M., Ruppert, C., Mahavadi, P., Henneke, I., Markart, P., Koch, M., Lang, G., Fink, L., Bohle, R.M., Seeger, W., et al. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178:838-846.
- 7) 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; 155:242-8.
- 8) Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(8):886-93.
- 9) Komatsu M, Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett*. 2010; 584(7):1374-8.
- 10) Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG: Structure of alveolar epithelial cells in patients with fibrotic lung disorders, *Lab Invest*. 1982; 46:39-53

特発性間質性肺炎における血管内皮機能に関する検討

相原 顕作¹ 半田 知宏^{1,2} 長井 苑子³ 谷澤 公伸¹
池添 浩平¹ 荏原 雄一¹ 原田 有香¹ 吉村 力⁴
小賀 徹⁴ 宇野賀津子⁵ 陳 和夫⁴ 三嶋 理晃^{1*}

背景：近年の複数の疫学研究の結果から、間質性肺炎の患者において心血管系の疾患のリスクが上昇し、呼吸不全に続く死因の上位を占めることが指摘されている。血管内皮は一酸化窒素をはじめとする多くの生理活性物質を産生して血管の恒常性を維持していることが知られ、動脈硬化はその機能障害を端緒として発症すると考えられている。間質性肺炎の患者においても心血管疾患発症に先行して血管内皮障害が生じている可能性があるが、他の動脈硬化危険因子との関係も含め明らかになっていない。

目的：間質性肺炎患者の体循環系の血管内皮機能とその関連因子を調査する。

対象と方法：心筋梗塞や脳梗塞などの心血管疾患の既往のない特発性間質性肺炎39症例(男/女=25/14, 平均年齢65歳)および健常者30例(男/女=20/10, 平均年齢63歳)の血管内皮機能をEndo-PAT (Itamar Medical)を用いて測定し、呼吸機能や6分間歩行検査などの疾患重症度や、糖尿病、脂質代謝異常など他の動脈硬化危険因子との関係を回帰分析を用いて検討した。ステロイド治療や酸素投与を受けている症例は除外した。

結果：間質性肺炎患者では健常者に比べて血管充血反応指数(reactive hyperemia index: RHI)が有意に低値であった。脂質、糖代謝に関しては、総コレステロール、トリグリセリド値やHbA1c、血糖に差を認めないものの、間質性肺炎患者ではHDLが有意に低値で、LDLが有意に高値であった。間質性肺炎患者において、RHIは一酸化炭素肺拡散能、肺泡気動脈血酸素分圧較差、6分間歩行距離および歩行後SpO₂と有意な正の相関を、血中可溶性細胞間接着分子-1、血管細胞接着分子-1濃度と負の相関を認めた。しかし一方、血圧や血清脂質、糖尿病の指標とは有意な関係を認めなかった。

結論：間質性肺炎患者では血管内皮障害を認め、原疾患の進行に伴う低酸素血症などにより誘導されている可能性がある。

¹ 京都大学大学院医学研究科呼吸器内科学

² 京都大学医学部附属病院リハビリテーション部

³ 京都健康管理研究会中央診療所 臨床研究センター

⁴ 京都大学大学院医学研究科呼吸管理睡眠制御学

⁵ ルイ・パストゥール医学研究センター

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

はじめに

近年の疫学研究の結果から、間質性肺炎の患者において心血管系の疾患リスクが上昇していることが指摘されている^{1,4}。実際に特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)の死因のほとんどは原疾患進行に伴う呼吸不全であるが、心血管疾患がそれに続く死因の上位を占めることが報告されている^{5,6}。間質性肺炎と心血管疾患とを結びつける要因としていくつかのメカニズムが考えられており、例えばインターロイキン-1 β (interleukin-1 β : IL-1 β)、IL-8、腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α : TNF- α)や細胞間接着分子-1(intercellular adhesion molecule-1: ICAM-1)といった炎症性サイトカインは間質性肺炎の病態と関わっているのみならず^{7,9}、動脈硬化の過程においても重要な役割を果たしている¹⁰。また、間質性肺炎では凝固系カスケードが亢進し、線維化の病態そのものとも関連していることが報告されている¹¹、疾患に伴う慢性の低酸素暴露は血管および周辺組織を障害して同部に不可逆的なリモデリングを惹起しうる¹²。

血管内皮は一酸化窒素をはじめとする多くの生理活性物質を産生して血管の恒常性を維持していることが知られ、動脈硬化はその機能障害を端緒として発症する¹³。すなわち、血管内皮の血管トーン、凝固系活性や炎症反応の制御機能が損なわれると血圧上昇、血栓傾向、炎症性サイトカイン産生や接着分子の発現へとつながり、最終的に心血管イベントが発症すると考えられている。血管内皮機能は主にそこから産生される一酸化窒素を介した内皮依存性血管拡張反応を定量化することで測定される¹³。血管内皮機能の非侵襲的な測定法としては超音波で阻血解除後の上腕動脈の径の変化を測定する方法がこれまで主に用いられてきたが、術者の手技に依存する部分が大きく標準化や再現性の問題などがあった。近年、指尖脈波の変化を測定して阻血解除後の血管充血反応の程度を自動定量化する機器が海外で開発され、国内外での大規模な適用試験の報告をもとにその有用性が認識されつつある^{14,15}。

間質性肺炎と心血管疾患の関連を示す疫学報告から、間質性肺炎の患者では心血管疾患発症に先行して血管内皮障害が生じている可能性が高いと考えられる。そこで我々は前述の指尖脈波計を用いて間質

性肺炎患者の血管内皮機能を測定し、健常人との比較や、糖尿病、脂質代謝異常などの他の動脈硬化危険因子との関係も含め検討した。

対象と方法

対象

当院を受診し、間質性肺炎と新規に診断された患者39例および年齢、性別、body mass index (BMI)、喫煙歴などを適合させた健常者30例を対象とした。膠原病の合併例や薬剤、環境要因などの関与が明らかな症例、他の肺疾患や心筋梗塞や脳梗塞などの心血管疾患の既往のある症例、ステロイド治療や酸素投与を受けている症例は除外した。IPFの診断は2011年の4学会合同ステートメントに基づいた¹⁶。本研究は当施設の倫理委員会の承認を受けた後、全患者より書面での同意を得て行った。

室内気吸入下安政臥位にて動脈血を採取し、動脈血酸素分圧(arterial partial pressure of oxygen: PaO₂)、動脈血二酸化炭素分圧(arterial partial pressure of carbon dioxide: PaCO₂)を分析した。肺泡気動脈血酸素分圧較差(alveolar-arterial oxygen pressure difference: A-aDO₂)は呼吸商を0.8として算出した。6分間歩行検査は米国胸部学会のガイドラインに基づいて施行した¹⁷。呼吸機能検査はチェスト社のCHESTACを用いて測定し、解析には%予測値を使用した。

指尖脈波を用いた血管内皮機能検査

被験者の末梢動脈の血管内皮機能をEndo-PAT 2000®(Itamar Medical)を用いて早朝空腹時に測定した^{14,15}。具体的な方法としては両方の示指に装着したプローブで指尖脈波を持続的に計測し、駆血しない側の一方をコントロールとして用いる。5分間の脈波計測の後に片腕を200mmHgまたは収縮期血圧+60mmHgの高い方の圧をかけて5分間駆血し、開放する。解放後1分間と駆血前2分半の間の脈波の平均の比をコントロール腕の脈波変化で補正した血管充血反応指数(reactive hyperemia index: RHI)が付属ソフトウェアにより自動算出される。内皮依存性血管拡張反応が強いほどRHIは高い値をとる。

表1 患者背景の比較

| | Patients (n=39) | Controls (n=30) | p value |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|---------|
| Sex, male/female | 24/15 | 20/10 | 0.80 |
| Age, years | 65.0±8.5 | 62.7±7.6 | 0.25 |
| BMI, kg/m ² | 24.2±3.4 | 23.2±3.2 | 0.23 |
| Smoking history, current/ex/never | 7/22/10 | 5/11/14 | 0.17 |
| Smoking, pack years | 29.4±27.3 | 17.5±24.3 | 0.07 |
| Systolic blood pressure, mmHg | 123.7±12.2 | 126.5±13.2 | 0.36 |
| Diastolic blood pressure, mmHg | 73.5±9.8 | 77.5±11.0 | 0.12 |
| Heart rate, bpm | 61.2±9.4 | 58.4±5.9 | 0.16 |
| Diabetic patients | 6 | 2 | 0.45 |
| Antihypertensive treatment | 9 | 10 | 0.42 |
| Statins use | 6 | 2 | 0.45 |

Data are presented as number or mean±SD.

BMI, body mass index.

動脈硬化危険因子を含む血中バイオマーカー測定

早朝空腹時に静脈血を採取し、総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール、トリグリセリド、HbA1c、血糖の値を測定した。また、Bio-Plex Pro Human Cytokine Assay (Bio-Rad Laboratories) を用いて可溶性ICAM-1、血管細胞接着分子-1(vascular cell adhesion molecule-1: VCAM-1)濃度を測定した¹⁸。

統計解析

統計解析はJMP® version 9 (SAS Institute)を使用して行った。定量的なデータの変動は標準偏差を用いて表記し、群間比較はカイ二乗検定もしくはt検定、2変量の関係は線形回帰モデルを用いて解析した。統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

患者背景

39名の間質性肺炎患者のうち、11名がHRCTで典型的な通常型間質性肺炎(usual interstitial pneumonia: UIP)パターンを示した。残りの28名の

うち12名に外科的肺生検を実施し、6例が病理学的にUIP、1例が非特異的間質性肺炎と診断された。5例は2002年の特発性間質性肺炎の国際多面的合意分類¹⁹では病理学的に分類困難であった。疾患群と健常群の背景因子を表1に示す。年齢、性別、BMI、喫煙歴、血圧、脈拍、糖尿病の罹患率、降圧剤やスタチンの服用率に統計学的有意差は認めなかった。

呼吸機能、動脈血液ガス、脂質や糖代謝に関する因子の比較を表2に示す。努力性肺活量(Forced vital capacity: FVC)、一酸化炭素肺拡散能(diffusing capacity for carbon monoxide: DL_{CO})は疾患群で有意に低かったが、PaO₂、PaCO₂、A-aDO₂には両群で有意差を認めなかった。総コレステロール値は両群で同等であったが、疾患群ではHDLが有意に低くLDLが有意に高かった。糖尿病の指標であるHbA1cと血糖については両群で有意差を認めなかった。

血管内皮機能とその関連因子

図1に示すように、疾患群のRHIは健常群と比べて有意に低下していた。間質性肺炎患者における血管内皮障害の関連因子を回帰分析を用いて検討したが、RHIは患者背景や血清脂質、糖尿病の指標とは

表2 呼吸機能、動脈血液ガス、脂質や糖代謝に関する因子の比較

| | Patients (n=39) | Controls (n=30) | p value |
|---|--------------------|--------------------|---------|
| <i>Pulmonary function</i> | | | |
| FVC, % predicted | 94.9±18.5 | 115.0±18.0 | <0.001 |
| DL _{CO} , % predicted | 51.2±13.0 | 87.3±13.2 | <0.001 |
| <i>Arterial blood gas data</i> | | | |
| PaCO ₂ , mmHg | 41.0±3.3 | 41.5±3.5 | 0.62 |
| PaO ₂ , mmHg | 83.5±10.7 | 83.4±11.0 | 0.98 |
| A-aDO ₂ , mmHg | 15.2±11.7 | 14.8±12.1 | 0.88 |
| <i>Laboratory cardiovascular risk factors</i> | | | |
| Total cholesterol, mg/dl | 208.4±34.2 | 207.0±32.6 | 0.86 |
| HDL, mg/dl | 47.1±11.1 | 57.6±16.3 | 0.002 |
| LDL, mg/dl | 133.7±30.6 | 116.7±20.8 | 0.01 |
| Triglycerides, mg/dl | 127.8±47.9 | 131.9±92.1 | 0.81 |
| HbA1c, % | 5.7±0.8 | 5.5±0.5 | 0.15 |
| Fasting glucose, mg/dl | 105.8±24.9 | 97.1±20.6 | 0.13 |

Data are presented as mean±SD.

FVC, forced vital capacity; DL_{CO}, diffusing capacity for carbon monoxide; PaCO₂, arterial partial pressure of carbon dioxide; PaO₂, arterial partial pressure of oxygen; A-aDO₂, alveolar-arterial oxygen pressure difference; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein.

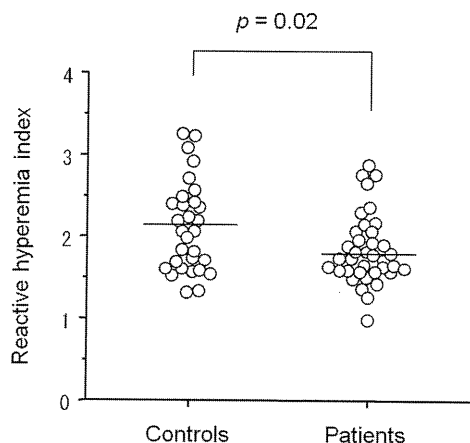


図1 血管充血反応指数(reactive hyperemia index: RHI)の比較。横線は平均値。

有意な相関を認めなかった(表3)。一方、RHIは疾患重症度の指標であるDL_{CO}、A-aDO₂、6分間歩行距離、歩行後SpO₂と有意に関係していた(図2)。FVC ($r=0.17$, $p=0.29$) や PaO₂ ($r=0.27$, $p=0.11$), PaCO₂ ($r=0.26$, $p=0.13$)とは有意な相関を認めな

かった。

疾患群におけるRHIと血中可溶性接着分子濃度との関係

間質性肺炎患者における血管内皮機能と血中可溶性接着分子濃度との関係を回帰分析を用いて検討したところ、RHIは血中可溶性ICAM-1 ($r=-0.30$, $p=0.07$), VCAM-1 ($r=-0.42$, $p=0.008$)濃度と有意またはほぼ有意な負の相関を認めた。

考 察

本研究により間質性肺炎患者で指尖脈波計を用いて測定した血管内皮機能が有意に低下していることが示された。その血管内皮障害の程度はDL_{CO}、A-aDO₂、6分間歩行距離、歩行後SpO₂といった疾患重症度や血中可溶性接着分子濃度と有意に関係していた。

表3 疾患群における血管充血反応指数と患者背景、脂質や糖代謝に関する因子との関係

| | Patients (n=39) | |
|---|--------------------|---------|
| | r value | p value |
| <i>Patient characteristics</i> | | |
| Age, years | 0.12 | 0.48 |
| BMI, kg/m ² | -0.22 | 0.19 |
| Smoking, pack years | -0.03 | 0.87 |
| <i>Laboratory cardiovascular risk factors</i> | | |
| Total cholesterol, mg/dl | 0.31 | 0.06 |
| HDL, mg/dl | 0.21 | 0.21 |
| LDL, mg/dl | 0.26 | 0.11 |
| Triglycerides, mg/dl | -0.18 | 0.26 |
| HbA1c, % | -0.05 | 0.77 |
| Fasting glucose, mg/dl | 0.06 | 0.73 |

BMI, body mass index; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein.

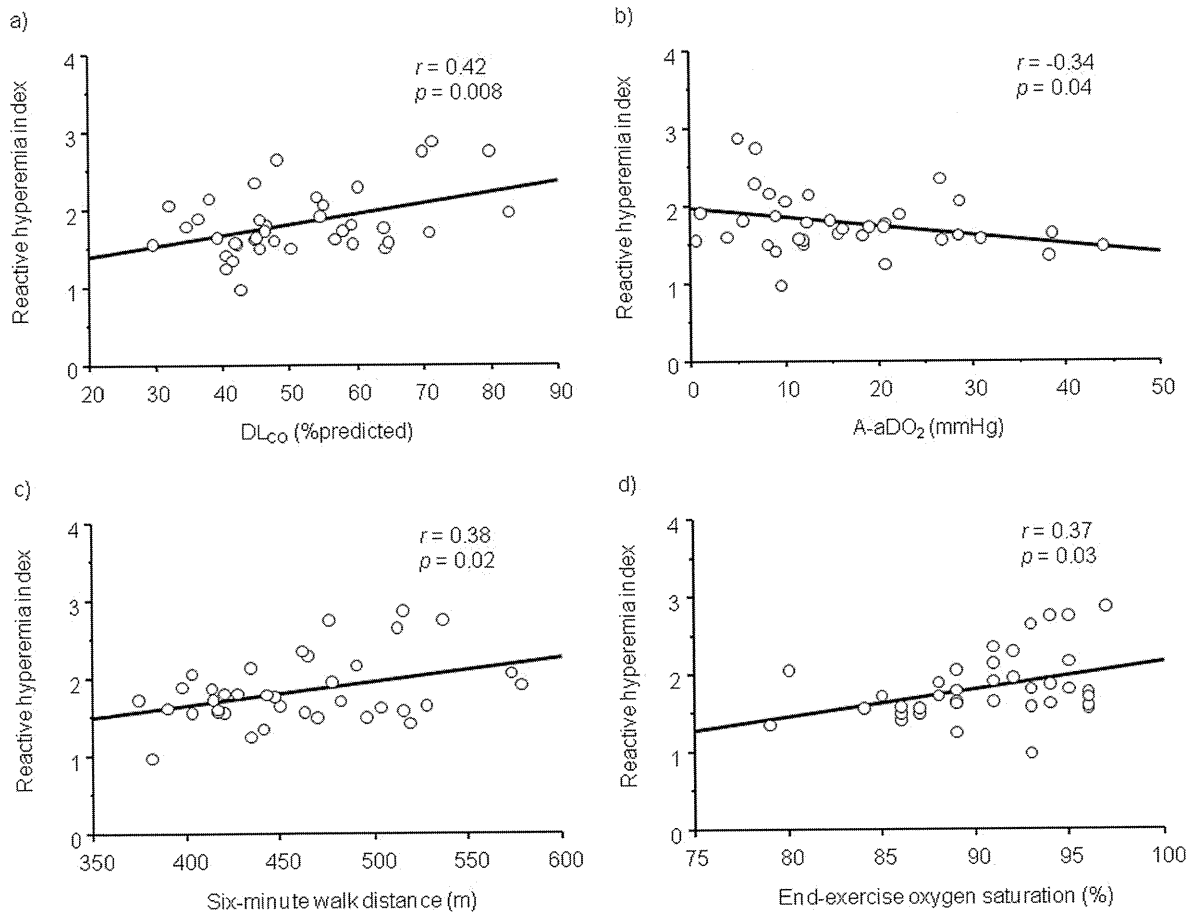


図2 疾患群におけるRHIと疾患重症度(DL_{CO}, A-aDO₂, 6分間歩行距離, 歩行後SpO₂)との関係. rはピアソンの相関係数.

血管内皮は多くの生理活性物質を産生して血管トーン、凝固系活性や炎症反応を制御しており、その機能障害は動脈硬化の発生、進展、そして心血管イベントの発症に寄与していると考えられている¹³。間質性肺炎患者における血管内皮機能の低下と疾患重症度との有意な関係は、近年の疫学研究¹⁴で示された本疾患における心血管疾患リスクの上昇を裏付けるものである。疾患の進行に伴う低酸素血症や、それによる身体活動制限が間質性肺炎患者における血管内皮障害のメカニズムの一端を担っているかもしれない^{20,21}。

機能障害をきたした血管内皮細胞ではエンドセリン-1²²、アンジオテンシン-2²³やプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1²⁴の産生が亢進しており、これらはいずれも肺の線維化と関わっていることが示されていることから²⁵⁻²⁷、逆に肺局所循環における内皮機能障害が線維化の進行を促進し、ガス交換能の低下につながっているかもしれない。本研究で評価した全身循環の血管内皮機能は必ずしも肺局所循環における血管内皮機能を反映するものではないが、間質性肺炎患者の肺内微小循環においても同様に内皮障害が存在し、各種メディエーターの産生を介して線維化の進行をきたしている可能性は十分あると考えられる。実際、IPFの最も重要なリスク因子の一つである喫煙¹⁶は、全身循環²⁸だけでなく肺局所循環²⁹においても内皮障害をきたすことが報告されている。

白血球の遊走、接着、内皮への侵入は動脈硬化の重要なプロセスであり³⁰、炎症性サイトカインや接着分子を介して行われる¹⁰。機能障害をきたした血管内皮細胞ではこれらの発現が亢進することが知られているが¹³、本研究でも実際に血管内皮機能の指標であるRHIと可溶性接着分子濃度は有意またはほぼ有意な負の相関を認めた。これは慢性閉塞性肺疾患などのように全身性炎症性疾患と認識されているわけではない間質性肺炎という疾患においても、血管レベルではわずかながらも炎症が生じていることを示唆している。

間質性肺炎患者では血清総コレステロール値に差がないにも関わらず健常人に比べて有意にHDLが低く、LDLが高かった。これが疾患自体が脂質代謝に影響を与えているためなのかどうかはまだわからない。肺局所に関して言えば、動物モデル³¹や

IPF患者^{32,33}の気管支肺胞洗浄液において脂質組成が変化していることが報告されている。また、IPF患者では閉塞型睡眠時無呼吸の頻度が高いことが報告され³⁴、その重要な病態的特徴である間欠的低酸素血症は血中脂質濃度に影響を与えることが動物実験で示されている³⁵。このように、疾患自体あるいは併存病態が脂質代謝に何らかの影響を与えている可能性があるが、詳しいメカニズムについては更なる検証が必要であろう。

本研究の限界として、サンプル数が少ないことや横断研究であることが挙げられる。間質性肺炎の病態と血管内皮機能障害の関係について理解を深めるため、治療に対する反応や予後との関連などを今後より多くの症例で検討していく必要がある。

間質性肺炎患者では血管内皮障害を認め、原疾患の進行に伴う低酸素血症などにより誘導されている可能性がある。今後、肺局所循環における血管内皮障害の有無や病態との関連を検討することで間質性肺炎の病態の理解がより深まることが期待される。

参考文献

- 1) Kizer JR, Zisman DA, Blumenthal NP et al. Association between pulmonary fibrosis and coronary artery disease. *Arch Intern Med* 2004; **164**: 551-556.
- 2) Hubbard RB, Smith C, Le Jeune I et al. The association between idiopathic pulmonary fibrosis and vascular disease: a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; **178**: 1257-1261.
- 3) Ponnuswamy A, Manikandan R, Sabetpour A et al. Association between ischaemic heart disease and interstitial lung disease: a case-control study. *Respir Med* 2009; **103**: 503-507.
- 4) Sprunger DB, Olson AL, Huie TJ et al. Pulmonary fibrosis is associated with an elevated risk of thromboembolic disease. *Eur Respir J* 2012; **39**: 125-132.
- 5) Panos RJ, Mortenson RL, Niccoli SA et al. Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: causes and assessment. *Am J Med* 1990; **88**: 396-404.
- 6) Hamada K, Nagai S, Tanaka S et al. Significance of pulmonary arterial pressure and diffusion capacity