

- of the lung as prognosticator in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2007; **131**: 650-656.
- 7) Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2011; **208**: 1339-1350.
 - 8) Ziegenhagen MW, Zabel P, Zissel G et al. Serum level of interleukin 8 is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and indicates disease activity. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157**: 762-768.
 - 9) Nakao A, Hasegawa Y, Tsuchiya Y et al. Expression of cell adhesion molecules in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 1995; **108**: 233-239.
 - 10) Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006; **86**: 515-581.
 - 11) Chambers RC. Role of coagulation cascade proteases in lung repair and fibrosis. *Eur Respir J Suppl* 2003; **44**: 33s-35s.
 - 12) Faller DV. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; **26**: 74-84.
 - 13) Widlansky ME, Gokce N, Keaney Jr JF et al. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; **42**: 1149-1160.
 - 14) Matsuzawa Y, Sugiyama S, Sugamura K et al. Digital assessment of endothelial function and ischemic heart disease in women. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**: 1688-1696.
 - 15) Hamburg NM, Benjamin EJ. Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2009; **19**: 6-11.
 - 16) Raghu G, Collard HR, Egan JJ et al. 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.
 - 17) ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **166**: 111-117.
 - 18) Kokkonen H, Soderstrom I, Rocklov J et al. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; **62**: 383-391.
 - 19) 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**: 277-304.
 - 20) Suvorava T, Lauer N, Kojda G. Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice. *J Am Coll Cardiol* 2004; **44**: 1320-1327.
 - 21) Ostergaard L, Stankevicius E, Andersen MR et al. Diminished NO release in chronic hypoxic human endothelial cells. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2007; **293**: H2894-H2903.
 - 22) Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M et al. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 2001; **104**: 1114-1118.
 - 23) Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 2001; **37**: 1047-1052.
 - 24) Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; **342**: 1792-1801.
 - 25) Park SH, Saleh D, Giaid A et al. Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **156**: 600-608.
 - 26) Otsuka M, Takahashi H, Shiratori M et al. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 receptor antagonist. *Thorax* 2004; **59**: 31-38.
 - 27) Senoo T, Hattori N, Tanimoto T et al. Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax* 2010; **65**: 334-340.
 - 28) Puranik R, Celermajer DS. Smoking and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis* 2003; **45**: 443-458.
 - 29) Gordon C, Gudi K, Krause A et al. Circulating endothelial microparticles as a measure of early lung

- destruction in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; **184**: 224-232.
- 30) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; **340**: 115-126.
- 31) Low RB, Adler KB, Woodcock-Mitchell J et al. Bronchoalveolar lavage lipids during development of bleomycin-induced fibrosis in rats. Relationship to altered epithelial cell morphology. *Am Rev Respir Dis* 1988; **138**: 709-713.
- 32) Robinson PC, Watters LC, King TE et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in bronchoalveolar lavage fluid phospholipids. *Am Rev Respir Dis* 1988; **137**: 585-591.
- 33) Fireman E, Spitzer S, Grief J et al. Cholesterol crystals in BAL fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 1996; **90**: 361-363.
- 34) Lancaster LH, Mason WR, Parnell JA et al. Obstructive sleep apnea is common in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2009; **136**: 772-778.
- 35) Li J, Savransky V, Nanayakkara A et al. Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2007; **102**: 557-563.

ブレオマイシン肺線維症モデルマウスにおける CD69分子の役割

山内 圭太¹ 粕谷 善俊² 黒田 文伸¹ 田中 健介¹ 露崎 淳一¹
石崎 俊介¹ 松永 博文² 岩村 千秋³ 中山 俊憲³ 巽 浩一郎^{1*}

【目的】特発性肺線維症(IPF)は慢性進行性疾患で、有効な治療法に乏しい予後不良の疾患である。ブレオマイシン(BLM)はIPFの動物実験モデルとして最も利用されている薬物である。一方、CD69分子はCタイプレクチンファミリーに属する膜分子でリンパ球の早期活性化マーカーとして広く用いられているが、近年、様々な実験モデルにおいて炎症性疾患との関わりが指摘されている。本研究ではIPFにおけるCD69分子の役割を検証する目的で、CD69ノックアウト(KO)マウスへのBLM投与をおこなった。

【方法】8週から10週齢の雄の野生型マウス及びCD69KOマウスにBLM 3mg/kgをPBSにて溶解し気管内投与した。コントロール群にはPBSのみを投与した。7日後に殺処分後、気管支肺胞洗浄液を採取し、さらに肺を凍結保存しRT-PCRに使用した。また14日後に肺を採取し病理組織評価、コラーゲン定量に使用した。観察期間中、連日体重を測定した。

【結果】CD69KOマウスは、野生型マウスと比較して有意に体重減少が抑制された。BLM投与7日後の気管支肺胞洗浄液中の白血球数と炎症性サイトカイン(IL-6,MCP-1,TIMP-1,sTNF-R)はKOマウスで有意に低かった。14日後の肺の線維化とコラーゲン含有量、さらにTGF- β mRNA量も軽減された。BLM投与した野生型マウス肺のCD69免疫染色をおこなったところ多くの肺胞内マクロファージにCD69発現を認めた。

【考察】CD69KOマウスではBLMによる肺の急性炎症、線維化が軽減された。今後、肺線維症の新規治療法の開発において、CD69分子が新たなターゲットになる可能性が示された。

千葉大学医学部

¹ 呼吸器内科

² 分子制御学

³ 免疫発生学

* 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

特発性肺線維症は原因不明で予後不良の疾患である。治療にはステロイドや免疫抑制剤が用いられるが、生命予後を改善するには至っていない。ブレオマイシン(BLM)はグリコペプチド系抗生剤の一つであるが、抗腫瘍効果を有しており頭頸部癌や胚細胞腫瘍の治療に利用されている。しかしながら重大な副作用として肺線維症があり、臨床で大きな制約となっている。BLMは肺線維症の動物実験モデルの作成に最も繁用されている。BLMの気管内投与により、初期には白血球の流入、肺肺炎、間質の炎症が生じる。初期の肺炎症に続いて線維芽細胞の増殖、細胞外マトリックスの増生、いわゆる肺の線維化が生じる。以上のBLM肺障害の過程では多くの炎症性細胞が複雑に関与するが、マクロファージおよび好中球が主に関与すると考えられている。

CD69分子はCタイプレクチンファミリーに属する膜分子で45kDの膜蛋白であるが、通常はホモダイマーとして存在している¹⁾。N末端から40番目までのアミノ酸が細胞内、41番目から61番目までの疎水性アミノ酸領域が膜貫通部位、62番目から199番目のアミノ酸が細胞外に位置していると考えられる。細胞外の6個のシステイン残基におけるジスルフィド結合によってダイマーを形成している。T細胞やB細胞を刺激すると数時間以内に発現が上昇することからリンパ球の活性化マーカーとして広く用いられているが、リンパ球のみならず活性化した好中球や好酸球などにも発現が認められている^{2,3)}。また抗体を用いたCD69活性化によって、マウスマクロファージの一酸化窒素、TNF- α の産生が亢進すること⁴⁾やNK細胞の細胞傷害活性が上昇すること⁵⁾が報告されている。これらの報告から、CD69分子は炎症シグナル伝達に促進的に機能し、肺線維症を含めた炎症性肺疾患の病態への関与が示唆された。そこで我々はCD69KOマウスと野生型マウスにBLMを投与、比較することでこれを検証した。

対象と方法

動物

雄のC57BL/6マウス(8-10週齢)を使用した。CD69KOマウス(C57BL/6バックグラウンド)は、気

管支喘息モデルを解析した当学免疫発生学教室より提供を受けた。取り扱いに際しては千葉大学のガイドラインにしたがった。

ブレオマイシン投与

実験前にマウス重量を計測し、トリブロムエタノールの腹腔内注射にて麻酔した。BLM(日本化薬、東京)3mg/kgをPBSで溶解し、Microsprayer (Penn-Centur社)を使用して単回気管内投与した。コントロールマウスにはPBSのみを気管内投与した。

肺内の水分含有量の測定

BLM投与から7日後にマウスを麻酔後に脱血死させ、右肺を摘出し重量を測定した(wet W)。その後、60°Cで24時間乾燥させ再度重量を測定した(dry W)。Wet W/dry Wを肺浮腫の程度の指標とし、これを各群で比較した。

気管支肺胞洗浄液(BALF)の採取

BLM投与から7日後にマウスを麻酔後に脱血死させた。20ゲージの金属針を気管内に挿入した後に1ml PBSで3回洗浄した。回収したBALFは遠心分離し、血球計算板で総細胞数をカウントし、Diff-Quick染色で細胞分画を算定した。またBALF上清は、-80°Cフリーザーに保存しサイトカイン、ケモカインの測定に提供した。

サイトカイン測定

BALF中のサイトカインは、Mouse Inflammation Antibody Array I(RayBiotech社)で測定した。このアッセイでは、ウェスタンブロット法によって80種類のサイトカイン/ケモカインの検出が可能である。プロトコールに忠実に従い実施した。

組織学的検査

肺組織は気管内投与の14日後に採取した。4%パラホルムアルデヒド固定後にパラフィン包埋し、8 μ mに薄切したのちHematoxylin-eosin染色およびMasson-trichrome染色をおこなった。肺の線維化の程度はAshcroftらの方法(J Clin Pathol 1988;41:467-470)に従って半定量的に評価した。100倍率にて1サンプルあたり20領域を任意に選択し、スコア0~8(0:正常な肺である、1:肺胞壁または細気管

支壁にごくわずかな線維性肥厚がある, 3: 肺構造の顕著な損傷はないが中程度の線維性肥厚がある, 5: 肺構造の明らかな損傷がある線維症であり線維性バンドか小さな線維状の塊がある, 7: 肺構造のひどい歪みがあり広範囲にわたって線維状領域がある, 8: 全視野が肺の線維化を起している)に評価した. スコアは各々のサンプルについて集計して求めた平均評価として表した.

コラーゲンアッセイ

気管内投与14日後の右下肺を0.1 mg/mlのペプシン酢酸溶液でホモジナイズし, その上清を4°Cで24時間インキュベートした. その後, 試料を遠心分離し, その上清中のコラーゲン含有量をSircolコラーゲンアッセイキットを用いて測定した.

RT-PCR

気管内投与7日後のマウス肺からISOGEN (WAKO)を用いてmRNAを抽出し, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA)でcDNAに逆転写した. 生成したcDNAをプライマー TGF- β : sense primer, 5'-CAACAACGCCATCTATGAGA-3'; antisense primer, 5'-TATTCCGTCTCCTTGGTTC-3', GAPDH: sense primer, 5'-GACCACAGTCCATGACATCACT-3'; antisense primer, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'を用い, TGF- β (94°C 45秒・52°C 1分・72°C 1分 30サイクル), GAPDH (94°C 40秒・60°C 1分・72°C 1分 25サイクル)の条件で反応させた. PCR産物は1.2%アガロースゲルで電気泳動後, UV下にエチジウムブロマイド染色し撮影した.

蛍光免疫染色

気管内投与2日後の肺を切離後, 4%PFAで固定, OCTで包埋したのち, 10 μ m厚に薄切した. 続いてCD69, IBA1の2重染色を実施した (CD69 1次抗体: anti-CD69 monoclonal antibody (Biolegend, San Diego, CA) 2次抗体: Alexa Fluor 594-conjugated anti-hamster Antibody, Iba1 1次抗体: anti-Iba1 polyclonal antibody (Wako chemicals, Tokyo), 2次抗体: Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit antibody). なおIba1陽性細胞の局在を確認するために anti-podoplanin/gp36抗体で染色した.

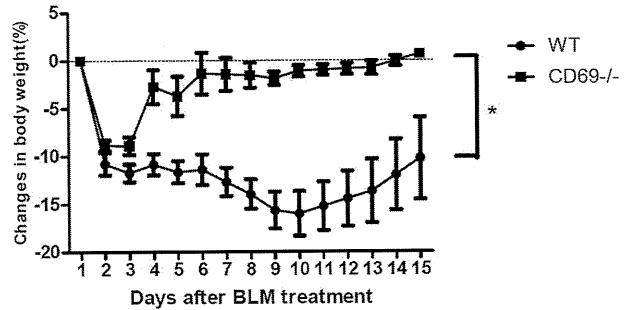


図1. 体重の変化

統計的分析

統計学的解析には, Student-t検定またはStudent-Newman-Keuls法を用い, $p < 0.05$ を以って有意とみなした.

結 果

体重変化

BLMによる急性肺障害におけるCD69欠損の生物学的意義を調べるために連日体重を測定した. 野生型マウスではBLM曝露後に継続的な体重減少を認めた. 対照的にCD69KOマウスは, 一時的に体重減少を認めたもののday4以降は増加に転じ, 両群間で有意差を認めた (図1).

BALF中細胞数および肺浮腫

CD69欠損がBLM誘発気道炎症へ与える影響を調べるため, 曝露7日後のBALF中炎症細胞をカウントした. BLM投与群はPBS投与群に比して総細胞数, マクロファージ数, リンパ球数, 好中球数いずれも有意に高かった. このBLMによる炎症細胞の増加はCD69KOマウスにおいて有意に抑制されていた (図2). さらに肺浮腫の指標となるwet/dry lung weight ratioもCD69KOマウスにおいて有意に低値であった (図3).

BALF中炎症性サイトカインの発現

Western blotting array解析では, PBS投与群と比較してBLM投与群では野生型マウス, CD69KOマウスいずれにおいてもいくつかの炎症性サイトカイン, ケモカインの発現が有意に増加した. 我々はIL-6, MCP-1, TIMP-1, sTNF-R1, sTNF-R2, およびMIP-1 γ に着目し, BLM投与した野生型マウス,

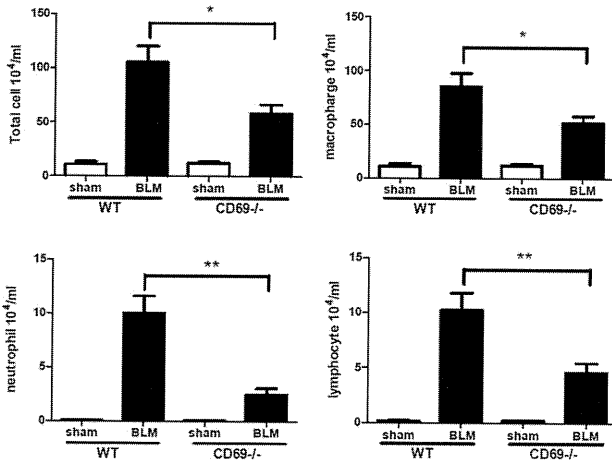


図2. BALF 中細胞

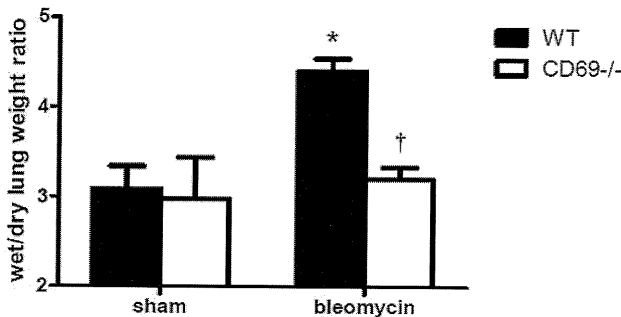


図3. wet/dry lung weight ratio

CD69KO マウス両群で比較したところCD69KO マウスでは有意にその増加が抑制された(図4A 及び 4B).

肺の組織学的および生化学的变化

気管内投与 14 日後の組織所見を図5に示す. 野生型マウス, CD69KO マウスのコントロール群に差は認めなかった. BLM 曝露した野生型マウス肺には著明な細胞浸潤と肺胞壁の肥厚, および線維化病変を認めた. 一方, BLM 曝露した CD69KO マウス肺においても同様の变化を認めたものの, 野生型マウスに比して軽度であり, 肺病変を定量化した Ashcroft score でも有意に低値であった(図6A). コラーゲンアッセイによる BLM 投与群の野生型マウス, CD69KO マウスの比較の比較においても CD69KO マウスで有意に低値であった(図6B). またさらに TGF- β mRNA 発現量についても同様の結果であった(図6C).

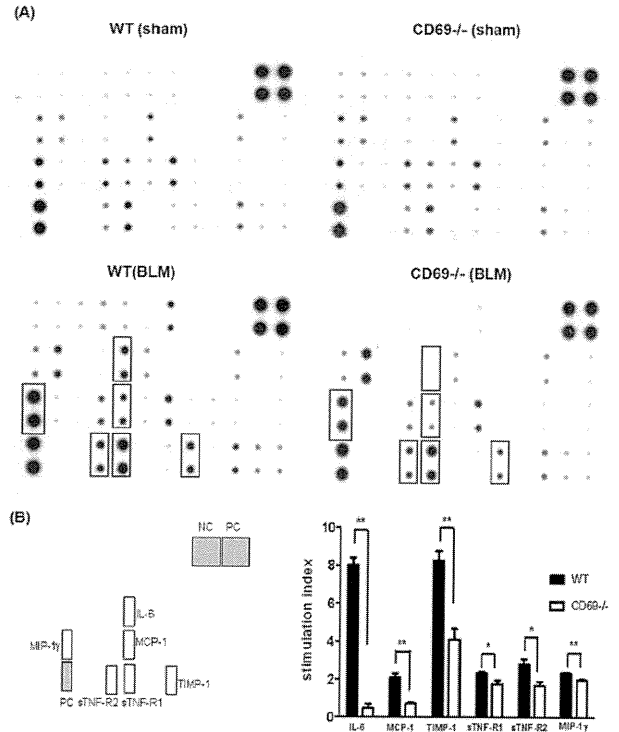


図4. BALF 中炎症性サイトカインの発現

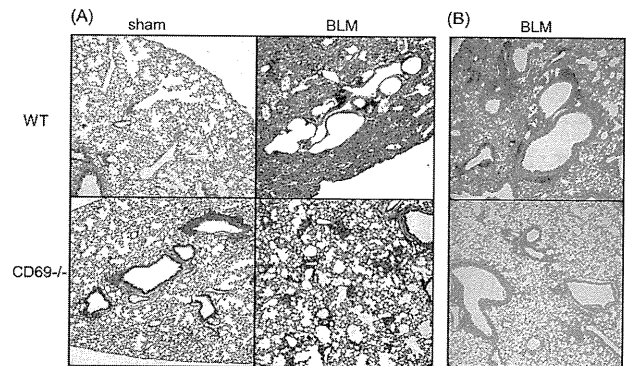


図5. 組織所見

BLM 投与後肺内の CD69 の局在

気管内投与 2 日後の野生型マウスで Iba1, CD69 を 2 重染色した. 野生型マウスのコントロール群では Iba1 陽性のマクロファージを認めるものの CD69 陽性のマクロファージはほとんど認められなかった. 一方, BLM 投与群では CD69 陽性マクロファージの明らかな増加を認め, BLM 曝露によってマクロファージ上の CD69 の発現が誘導されていると示唆された. さらに podoplanin/gp36 染色によって肺胞マクロファージ, 肺間質マクロファージ双方に CD69 が発現していることが確認された(図7). なお BLM 2 日後の肺内にはリンパ球および好中球はわず

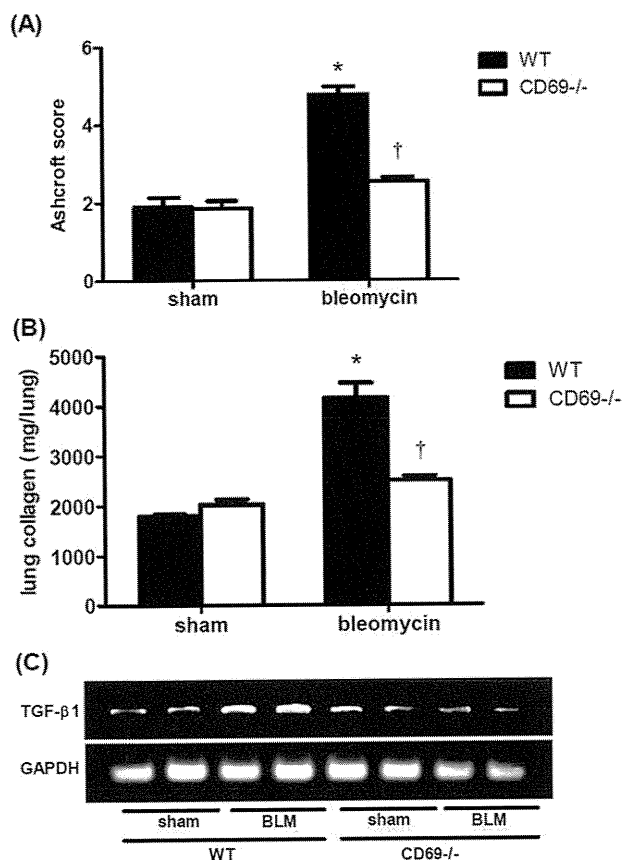


図6. 肺線維化の評価

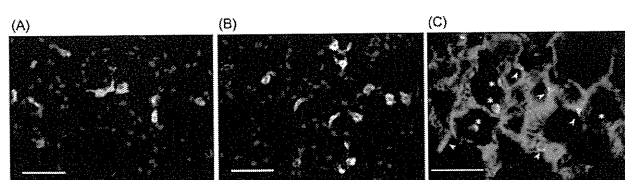


図7. 肺のマクロファージCD69の発現

かに確認されるのみであった。

考 察

CD69は、リンパ球の早期活性化マーカーとして知られ、様々な疾患の炎症過程において重要なシグナル伝達に関与する。事実、慢性肝炎や関節リウマチの炎症部位に浸潤した白血球にCD69発現を認め、さらに近年、アレルギー性気道炎症の進展に関与することが報告されている⁹⁾。今回、これらの知見をもとにCD69分子のBLMによる肺障害への関与を調べるため、我々はCD69KOマウスと野生型マウスにBLMを投与、比較することでこれを検証した。

BLMによる肺障害では肺内への炎症性細胞の流入および炎症性サイトカイン産生に代表される炎症期が先行し、その後の線維化の程度に大きく影響するが、本実験においてもBLM気管内投与後7日目のBALF中の白血球数および肺内水分量の増加を認めた。これらの変化は野生型マウスに比しCD69KOマウスで有意に抑制されていた(図2,3)。両群の炎症反応の差は、全身状態を反映する体重減少の程度(図1)に相関しており、CD69KOマウスはBLM性肺障害に抵抗性を有することが示唆された。またWestern blotting array解析では、MCP-1、IL-6、TIMP-1、sTNF-α receptor産生がCD69KOマウスにおいて有意に抑制されたが、これらのサイトカイン、ケモカインが肺線維症の病態に深く関与することがすでに多くの研究で報告されている。したがってこれらのサイトカイン、ケモカインの産生抑制がBLMによる急性肺炎とその後の線維化の低減につながったと考えられた。

TGF-β1過剰発現とそれによる線維芽細胞の増生、細胞外マトリックスの沈着は肺線維症の重要な病態であるが、TGF-β1等の線維化マーカーは初期の炎症性サイトカイン産生亢進によって促進されることが知られている。例えばMCP-1はTGF-β1の発現亢進によって線維芽細胞内のコラーゲン産生を促進することが報告されている⁷⁾。またsTNF-α receptorはTGF-β1産生亢進を促すTNFシグナル伝達に不可欠であり、sTNF-α受容体欠損マウスはBLMによる肺線維化に抵抗性を有すると報告されている⁸⁾。したがって、今回BLM曝露後CD69KOマウス肺のTGF-β1 mRNAは野生型マウスに比して著しく抑制されていた(図6C)が、これが前述のBALF中MCP-1、sTNF-α receptorの抑制効果に起因している可能性が考えられた。

蛍光免疫染色によってBLM曝露初期のマウス肺内のCD69局在を検証したところ、マクロファージに優位に発現していることがわかった。マクロファージは肺線維症にかかわる様々な炎症性細胞の中でも中心的な役割を担うと考えられている。活性化したマクロファージは数多くのサイトカインや酵素、メディエーターを産生し、炎症性細胞や線維芽細胞の機能を制御する。過去のin vivo, in vitro実験でBLM曝露した肺胞マクロファージから炎症性サイトカインやTGF-β1が産生され、肺線維化を促進

することが報告されている⁹⁾。これらからBLM刺激により活性化した肺マクロファージは、肺炎症/線維化を生じさせる化学伝達物質の主要な産生源として機能すると考えられる。

マクロファージ上のCD69分子がいかに肺線維症の病態に関与するかは定かでない。過去の報告によると、CD69がマウスマクロファージの活性化のトリガーとして機能し、また抗CD69抗体刺激によってマクロファージからの一酸化窒素の産生およびTNF α 分泌が亢進すると言われている。さらに近年、CD69の抗体刺激によってマクロファージからのTGF- β 産生も促進されると報告されている^{10,11)}。我々は野生型マウス、CD69KOマウスそれぞれから腹腔内マクロファージを単離しLPS刺激した際のサイトカイン/ケモカインの産生パターンを比較し、明瞭な差異があることを確認した。したがって炎症過程におけるマクロファージの活性化にCD69が促進的に働き、CD69/TGF- β ループが肺線維化に直接的に関与していることに疑う余地はない。しかしCD69のリガンドは未だ特定されておらず、BLMの傷害部位にCD69のリガンドが発現しているか否かは不明である。上皮間葉移行の概念に立てば傷害部位の上皮細胞にCD69リガンドが発現しているとすれば非常に興味深い。いずれにせよ肺線維症におけるCD69の分子細胞レベルでの機序の解明が求められる。

結 論

我々はCD69ノックアウトマウスがブレオマイシンによる肺炎症/線維化に抵抗性を有することを示した。CD69分子は肺線維症の新規治療開発のターゲットとなりうると考えられる。

文 献

- 1) Ziegler SF, Ramsdell F, Hjerrild KA, et al.:Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. *Eur J Immunol* 1993, 23(7):1643-1648.
- 2) Gavioli R, Risso A, Smilovich D, et al.: CD69

molecule in human neutrophils: its expression and role in signal-transducing mechanisms. *Cell Immunol* 1992, 142(1):186-196.

- 3) Morii T, Nishikawa K, Ako H, et al.: Expression of activation antigen, CD69, on human local eosinophils. *Arerugi* 1994, 43(4):557-562.
- 4) Marzio R, Jirillo E, Ransijn A, et al.: Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 1997, 62(3):349-355.
- 5) Moretta A, Poggi A, Pende D, et al.: CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med* 1991, 174(6):1393-1398.
- 6) Miki-Hosokawa T, Hasegawa A, Iwamura C, et al.: CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. *J Immunol* 2009, 183(12):8203-8215.
- 7) Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH: Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 1996, 271(30):17779-17784.
- 8) Ortiz LA, Lasky J, Hamilton RF Jr, et al.: Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice. *Exp Lung Res* 1998, 24(6):721-743.
- 9) Khalil N, Whitman C, Zuo L, et al.: Regulation of alveolar macrophage transforming growth factor-beta secretion by corticosteroids in bleomycin-induced pulmonary inflammation in the rat. *J Clin Invest* 1993, 92(4):1812-1818.
- 10) Esplugues E, Sancho D, Vega-Ramos J, et al.: Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *J Exp Med* 2003, 197(9):1093-1106.
- 11) Sancho D, Gomez M, Viedma F, et al.: CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 2003, 112(6):872-882.

肺胞上皮細胞アポトーシスに対する pirfenidone の作用検討

前山 隆茂 横山 哲也 緒方 彩子 鈴木 邦裕
濱田 直樹 原田 英治 中西 洋一*

背景・目的：肺胞上皮細胞のアポトーシスは肺線維化病態に重要な関わりを持つ。pirfenidone(PFD)は抗線維化作用以外にサイトカイン抑制作用や抗酸化作用を持つと報告されている。肺胞上皮アポトーシスに対するPFDの効果を検討した。

方法：マウス肺胞上皮細胞LA4にLPSあるいはH₂O₂を投与しアポトーシスを誘導した。PFDを添加し、アポトーシスの程度をflow cytometryで評価した。また細胞内アポトーシス関連因子の発現をWestern blot法で検討した。

結果：PFDはLPSあるいはH₂O₂によるLA4細胞のアポトーシスを有意に抑制した。PFDはcaspase-8とcaspase-3の活性化を抑制したが、Bcl-2ファミリー蛋白に影響しなかった。

結論：PFDは肺胞上皮細胞のアポトーシスを抑制する作用を持つことが示唆された。

A. 研究目的

間質性肺炎の病態機序は未だ不明であるが、初期事象として未知の刺激による繰り返す肺胞上皮傷害が生じ、傷害修復が不適切なものとなり、肺胞上皮細胞と線維芽細胞間の正常な相互作用は破綻し、線維芽細胞の過剰な活性化、肺線維化が引き起こされると考えられている。肺上皮細胞傷害の機序としてアポトーシスは重要であり、ヒト特発性肺線維症あるいは疾患動物モデルの肺胞上皮細胞中では細胞内アポトーシス関連因子の発現が増強していること、過剰なアポトーシスを生じていることが報告されている。アポトーシスを誘導する刺激としてはFasやTNFなどをリガンドにもつdeath-receptorシグナルを介するもの、あるいは酸化ストレスや小胞体ストレスといった細胞内シグナルを介するものが考えられている。

Pirfenidone (PFD)は、新規抗線維化薬であり、特発性肺線維症に対すると治療薬として日本、EUで適応承認された。PFDは抗線維化作用以外に抗炎症作用、抗酸化作用を持つことが動物や培養細胞を用いた研究から明らかとなっているが、PFDの薬理作用には不明な点も多い。最近、ラット腎硬化症モデルにおいて腎尿細管上皮細胞のアポトーシスをPFDが抑制したとの報告がなされた。PFDの抗アポトーシス作用について検討はほとんどされていないため、肺上皮細胞に対する抗アポトーシス作用について

て検討した。

B. 研究方法

マウス肺胞上皮細胞株(LA4)をF12K培地で培養した。アポトーシス誘導刺激には過酸化水素(H₂O₂, 1 mM)あるいはlipopolysaccharides (LPS, 10 µg/ml)を用いた。アポトーシス刺激と同時にLA4細胞にPFD(500または1000 µg/ml)を添加して24時間培養した。アポトーシスはアネキシンVとヨウ化プロピディウムによる標識法を用いてフローサイトメトリーで検出した。細胞内アポトーシス関連因子として、caspase-3, caspase-8, BAX, Bcl-X_L, cytochrome cの蛋白発現をWestern blotで検討した。

C. 研究結果

C.1. H₂O₂ 誘導アポトーシスに対する PFD の効果

H₂O₂ 1 mM 処理後、アポトーシスを呈したLA4細胞の割合は増加した。PFD 500µg/mlを同時投与するとアポトーシス細胞数は減弱傾向となり、1000µg/mlでは有意に抑制された(図1A)。PFD投与によって細胞内のBaxとcytochrome cの蛋白発現は減少した。また活性化型を示すcleaved caspase-3量も減少した(図2)。

C.2. LPS 誘導アポトーシスに対する PFD の効果

LPS 10µg/ml投与にてLA4のアポトーシス割合は

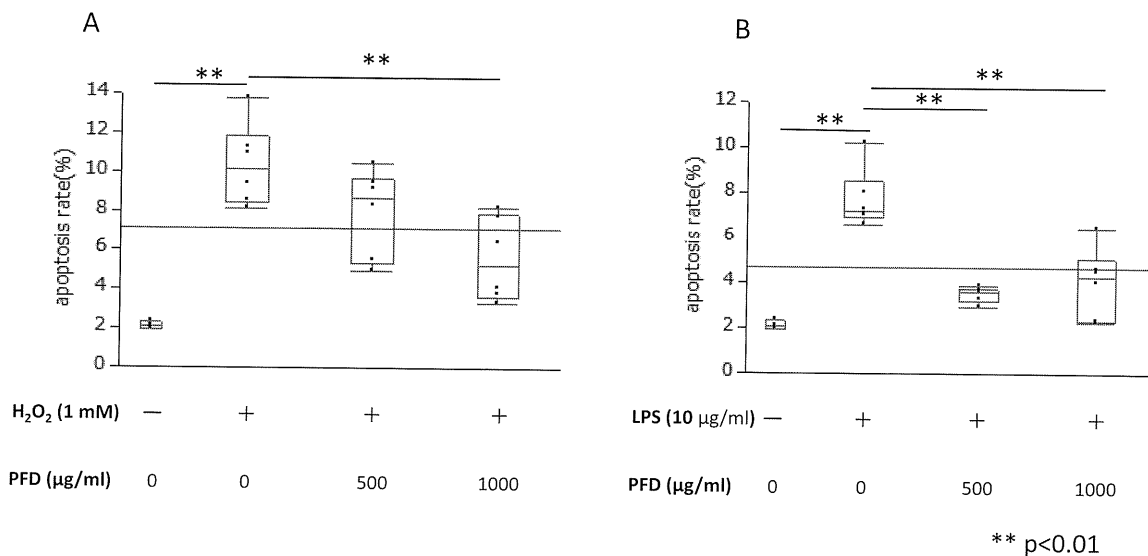


図1. アポトーシス誘導刺激(A; H₂O₂, B; LPS)に対する pirfenidone(PFD)の効果

増加した。PFD同時投与によってアポトーシス割合は濃度依存性に抑制された(図1B)。PFD投与によって細胞内の活性化caspase-8(cleaved caspase-8)と活性化caspase-3(cleaved caspase-3)はいずれも減弱した(図3)。

D. 考察

PFDは抗線維化薬として特発性肺線維症に対して適応承認を受けた新規薬剤である。その主要機序は、TGF-βやPDGFなど線維化形成を促進するサイトカインの産生抑制にあると考えられている。このほかTNF-α, IL-1β, IL-6などプロインフラマトリサイトカインを抑制する抗炎症作用、抗酸化作用をもつことが動物疾患モデルや培養細胞系を用いた実験で報告されている。アポトーシスに対する作用に関しては、Shihabらがラット腎硬化症モデルにおいて腎尿

細管上皮細胞のアポトーシスをPFDが抑制した報告しているが、この抗アポトーシス作用が直接作用なのか、サイトカイン抑制を介した間接作用なのかは検討されていない。そこで我々は肺上皮アポトーシスに対するPFDの作用をin vitroで検討した。PFDはH₂O₂, LPSいずれの刺激によるアポトーシスにも抑制作用を示した。H₂O₂は酸化ストレスであり、BAXは酸化ストレスをセンスしてミトコンドリアからのcytochrome c放出を誘導、さらにcaspaseが活性化されてアポトーシスが誘導される。PFDはH₂O₂によるBAX増強とcytochrome cを抑制しており、すでに知られているPFDの抗酸化作用が、酸化ストレス誘導性アポトーシスに抑制的に作用したと考えられる。一方LPSは細胞膜上のtoll-like receptor4に結合して種々のシグナル伝達を行うが、LPSによるアポトーシスシグナルはcaspase-8を介するものと、ミトコンドリアを介する2つの経路が想

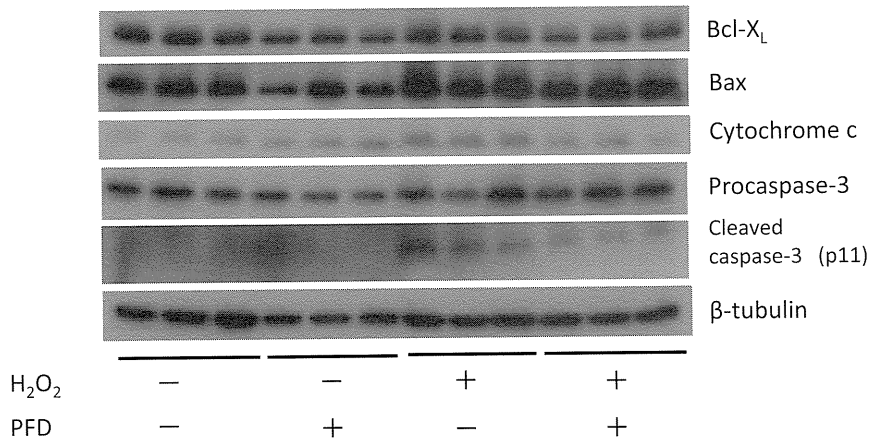


図2. H₂O₂刺激による細胞内アポトーシス関連蛋白の変化

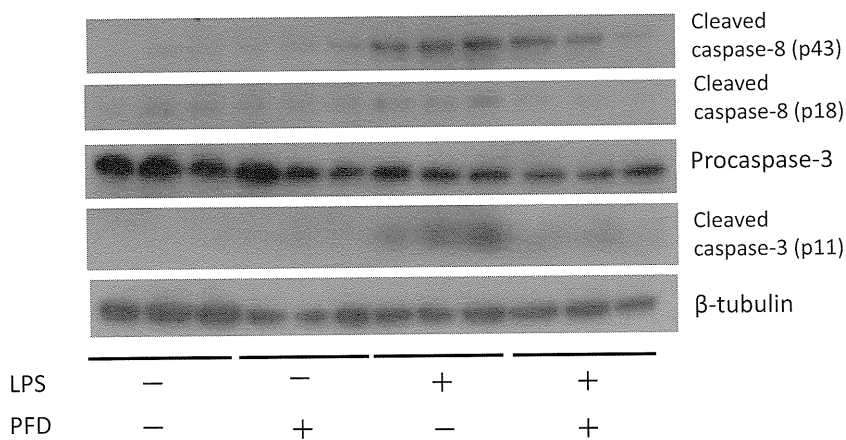


図3. LPS刺激による細胞内アポトーシス関連蛋白の変化

定されている。今回の検討ではLPS刺激によるcaspase-8活性化をPFDが抑制していたことから、レセプターからcaspase-8へのシグナル伝達過程にPFDが作用していることが推定され、今後の検討課題である。

E. 結語

PFDは酸化ストレスおよびLPSによる膜レセプターを介したアポトーシスに対して肺胞上皮細胞保護作用をもつ可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

EGFR Tyrosine Kinase Inhibition Worsens Acute Lung Injury in Mice with Repairing Airway Epithelium. C. Harada, T. Kawaguchi, S. Ogata-Suetsugu, M. Yamada, N. Hamada, T. Maeyama, R. Souzaki, T. Tajiri, T. Taguchi, K. Kuwano, and Y. Nakanishi. Am J Respir Crit Care Med. 2011 Mar 15;183(6):743-51.

H. 的財産権の出願・登録状況

なし。

HSP70による肺線維化抑制と、ゲフィチニブによる 薬剤性肺線維症への関与

水島 徹¹ 田中健一郎¹ 難波 卓司¹ 吾妻安良太^{2*}

HSP70は細胞をストレスに耐性化するタンパク質であり、アルツハイマー病など様々な疾患に対する予防効果が知られている。我々は、ブレオマイシン誘導性肺線維症モデルを用いて、肺線維化に対するHSP70の効果を検討した。野生型マウスに比べ、HSP70過剰発現マウスではブレオマイシンによる肺の線維化、及び肺機能低下が顕著に抑制されていた。またこのメカニズムを検討したところ、HSP70は抗炎症作用、TGF- β 1を減らす作用、及びTGF- β 1依存の上皮間葉転換を抑制する作用も持つことを発見した。

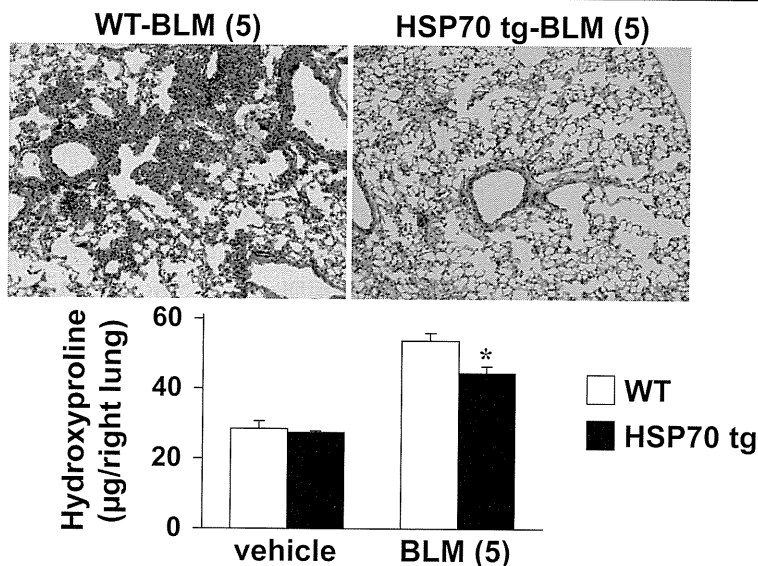
一方我々は、薬剤性肺線維症を起こす薬剤の中にHSP70を減らす薬剤があるのではないかと考え、ゲフィチニブがHSP70量を減少させることを見出した。またゲフィチニブ依存に肺の線維化を起こす動物モデルを確立し、このモデルにHSP70を増やす薬を投与すると、ゲフィチニブ依存の肺線維化も抑制されることを見出した。以上の結果は、ゲフィチニブはHSP70を減少することにより肺線維化を起こすこと、及びHSP70を増やす薬がこの肺障害・肺線維症の抑制を担う可能性を示唆している。

¹ 慶應義塾大学薬学部

² 日本医科大学

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

Masson's trichrome staining and Hydroxyproline assay



Tanaka et al. *Biochem. Pharmacol.* 2010

図1 HSP70 による、肺繊維化の抑制

はじめに

加齢に伴う線維化病態は肺障害を背景とした肺胞上皮の傷害に続く線維化促進が注目され、ならびに上皮間葉転換(EMT)もそのメカニズムの重要な一つと考えられている。特に特発性肺線維症(IPF)では炎症を伴わずとも、上皮細胞の死滅と線維症の不可逆的進行が特徴で、時にGefitinibを代表とする薬剤投与に伴い、急性増悪を来し、ARDSをきたした末に死亡する。我々はこれまでIPFの病態を再現する動物モデルが確立されていないこと、ならびに治療薬の評価、新薬候補の効果、副作用予測が十分に出来ない現状において、その評価系モデルを確立することが、IPF治療薬の開発にも、また副作用を誘発する新薬候補の除外(副作用の予防)にも繋がるとの考えに基づいて、研究を進めてきた。

肺線維症発症のメカニズムとして活性酸素種(ROS)、アレルギー反応やある種の薬剤による肺障害などが引き金となり、1)肺胞上皮、気道上皮あるいは血管内皮の細胞死誘導、2)炎症反応促進(TNF α , IL-1 β , IL-6などの産生)、さらに3)線維化促進(TGF β 産生促進, EMT誘導, 骨髄由来fibrocyteのリクルートなど)を介して間質性肺炎の発症と線維症の促進が平行すると考えられる。

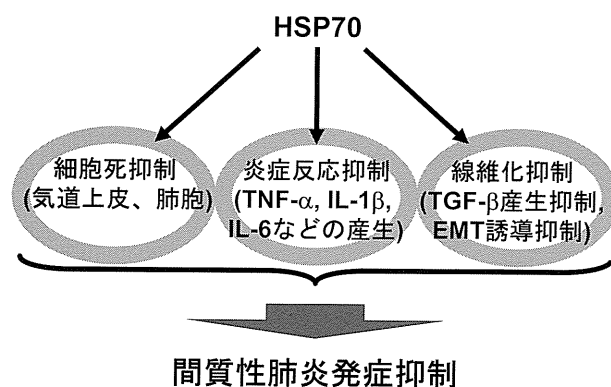


図2 HSP70によるIPF抑制メカニズム

方法と結果

これまでにブレオマイシン(BLM)を用いた肺障害モデルにおいて、上皮細胞に特に高発現誘導される熱ショック蛋白(HSP)70を遺伝子導入したマウス(HSP70tg)ではBLM誘発肺線維症が軽減されることを見だし(図1)、報告した。Ref 1) すなわちHSP70の発現は細胞死を抑制し、炎症反応を抑制、強いては線維化抑制を誘導する。(図2)

そこで我々は薬剤起因性肺障害においてもHSP70が重要な役割をしている可能性を考え、以下の研究を推進した。

まず、薬剤性肺障害をきたす報告のある薬剤を

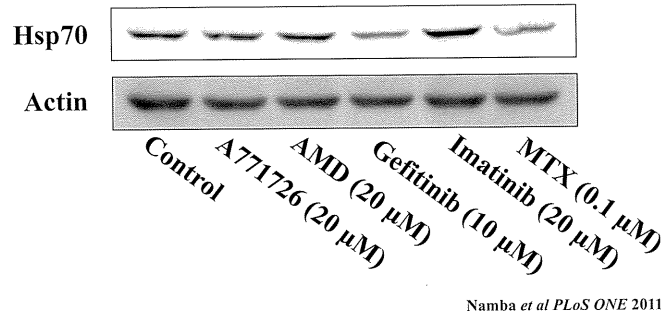


図3 種々の薬剤によるHsp70の発現変化

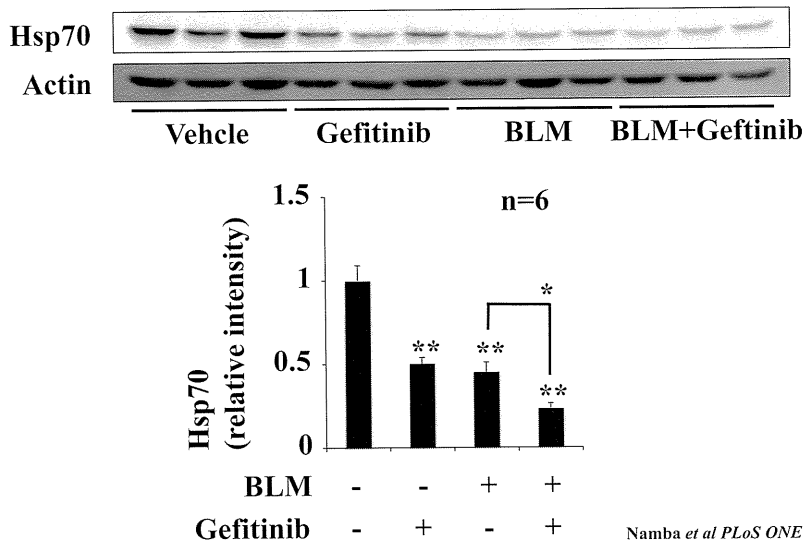


図4 GefitinibによるHsp70の発現抑制

A549細胞に作用させ、HSP70の発現変化を検討した。EGFR-TKIであるGefitinib、ならびにMethotrexate (MTX)においてHSP70の発現が抑制されることが判明した (ref2)。(図3)GefitinibはmiRNAを誘導し、HSP70翻訳を抑制し、発現が抑制される。

そこでGefitinib投与によるマウス線維化モデルを作成した。まず3日間Gefitinib 200mg/kg/回を投与し、BLM 1mg/kg it投与したのち、1日おきにGefitinib投与を14日間継続し、肺線維化の程度を検証した。BLM 1mg/kg it投与は、単独で肺線維症をきたす濃度ではない。その結果、HSP70の発現はBLM単独でも減少し、Gefitinibでも減少、BLM+Gefitinibでさらに減少した。(図4) また、病理組織ではBLM+Gefitinib投与群で線維化が著明に認められた。(図5) またHSP70過剰発現マウス(HSP70tg)では、いずれの群でも線維化が軽減された。

これまでの報告から、胃粘膜保護薬として汎用されているTeprenone (Geranylgeranylacetone; GGA)は

安全性の高いHSP70誘導剤である。(図6) そこでGefitinib+BLM誘発肺線維症モデルにGGAを投与したところ、線維化が抑制されることを見出した。(図7) この結果はGefitinib単独あるいはたとえ低用量であっても細胞障害性の薬剤(BLM)とGefitinib併用により増強される肺障害ならびに線維化を、Teprenoneが抑制することを示している。

まとめ

低用量BLM投与にGefitinib併用により誘発される肺線維症はGGA投与により抑制された。これはHSP70がGGAにより誘導されたことにより、肺線維症が抑制されたと理解できる。一般に致死的病態である特発性肺線維症の急性増悪(IPF-AE)は、さまざまな誘因で誘発される。Gefitinib(EGFR-TKI)はHSP70を抑制し、EMTを誘発し、上皮細胞の脆弱性を司る。このことは抗癌作用の一つであるとも

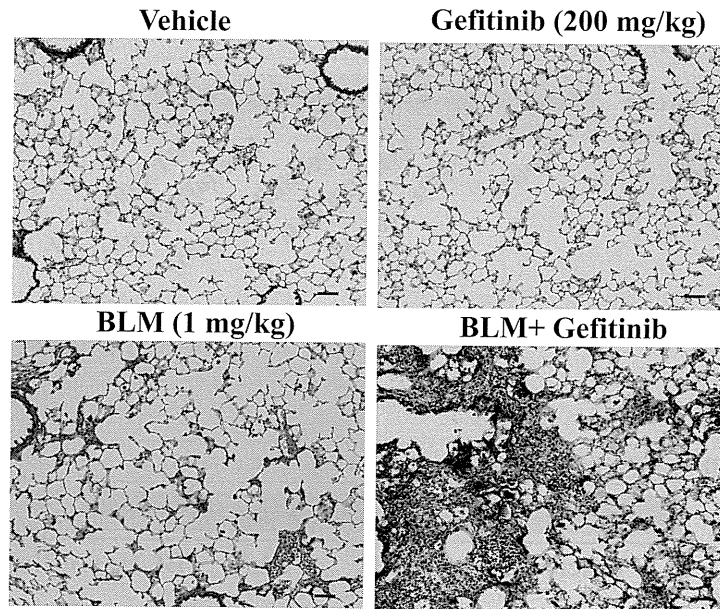


図5 BLMと Gefitinib 投与による肺組織の線維化促進

- 世界で唯一の毒性のないHSP誘導剤
- 胃粘膜保護薬（テプレノン、セルベックス）として市販
- 日本で最もよく使われている胃薬の一つ

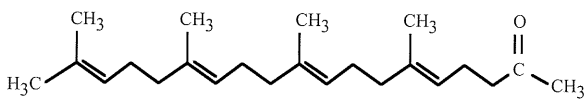


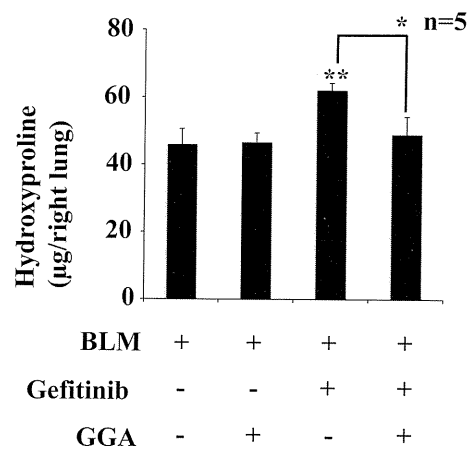
図6 Geranylgeranylacetone (GGA)

に、IPF-AEの誘因となる可能性を秘めている。

実際の臨床症例においてもHSP70の発現効率を検討することは、IPF-AEの機序解明に通じる可能性があり、HSP70増強剤として、Teprenoneの至適投与量、投与方法につき検討する価値がある。

文 献

1) Tanaka K, Tanaka Y, Namba T, Azuma A, Mizushima T. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice .



Namba et al PLoS ONE 2011

図7 GGA投与はBLMとGefitinibによる肺線維化を抑制する

Biochem Pharmacol. **80(6)**: 920-31, 2010. Jun 1. [Epub ahead of print]

2) Namba T, Tanaka K, Tatsuya Hoshino T, Azuma A and Mizushima T. Suppression of expression of heat shock protein 70 by gefitinib and its contribution to pulmonary fibrosis. *Public Library of Science (PLoS) One* **6(11)**: e27296, 2011.

Fibrocyteの肺線維芽細胞に対する作用の検討

青野 純典 阿部 秀一 西岡 安彦*

【背景】末梢血における骨髄由来間葉系前駆細胞fibrocyte数とIPF患者予後との相関が報告され注目されている。一方でfibrocyteの肺線維症における役割は未だ不明である。Fibrocyteの肺線維芽細胞に対する役割を中心に検討した。【方法】Fibrocyte培養上清中の増殖因子濃度をELISAを用いて検討した。さらにヒト末梢血由来fibrocyteとの共培養によるヒト肺線維芽細胞のfibrocyte依存性増殖反応について³H-チミジン取り込み試験を用いて検討した。Fibrocyte培養上清刺激肺線維芽細胞lysateにおける α -SMA発現をウェスタンブロット法にて検討した。【結果】Fibrocyte培養上清中に各種増殖因子濃度の上昇を認めた。ヒト肺線維芽細胞はfibrocyteの濃度(個数)依存性に増殖反応を示した。Fibrocyte培養上清刺激肺線維芽細胞にて α -SMAの発現が亢進していた。【考察】fibrocyteは線維芽細胞の増殖や筋線維芽細胞への分化を誘導することで肺線維化促進に関わっている可能性が示唆された。

¹ 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部呼吸器膠原病内科学

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

はじめに

肺線維症の進展に重要な役割を果たしている線維芽細胞の起源としてレジデントの線維芽細胞以外に、骨髄由来の間葉系前駆細胞である fibrocyte が存在している [1]. Fibrocyte は血球系マーカーの CD45, 幹細胞マーカーの CD34, ケモカインレセプターである CXCR4, CCR7 等の発現と同時に線維芽細胞の産生物であるコラーゲン1, ビメンチン, フィブロネクチンなどを産生することを特徴としている [1, 2]. 末梢血中の fibrocyte は, SDF-1-CXCR4 シグナルをはじめとする遊走刺激により肺へ遊走し, 血球系マーカーの発現を失い線維芽細胞に分化し肺線維化に関わっていることが分かっている [3, 4]. また末梢血における fibrocyte 数が特発性肺線維症患者にて健常人と比較し有意に高く, 特に急性増悪時に著増すると同時に, 特発性肺線維症患者予後との相関が報告されている [5]. 肺線維症と fibrocyte の関係に注目があつまっているが, 一方で fibrocyte の肺線維症における役割についてはその詳細は不明である. 最近, 我々が報告した肺線維症における SP-D の抗線維化作用の検討にて, BLM 刺激マウス肺から分離した fibrocyte がコントロールマウス肺由来の fibrocyte と比較し TGF- β 1 の発現が亢進していることが分かった [6]. 以上から我々は, 線維化環境にて fibrocyte から増殖因子発現が亢進し肺線維化を促進していると考えた. 今回は fibrocyte の増殖因子産生を介した肺線維芽細胞に対する作用を中心に検討した.

方 法

ヒト末梢血より単核球を分離し, フィブロネクチンコートしたプラスチックにて約1週間培養後, 接着細胞を分離し, AutoMACS を用いて CD3(T細胞), CD19(B細胞), CD14(単球)でネガティブセレクションによりヒト fibrocyte を分離した. フローサイトメトリーならびに免疫染色にて分離された細胞の発現マーカーを検索することにより fibrocyte であることを確認した. ヒト fibrocyte を 96well プレートにて培養し, 培養上清中の各種増殖因子濃度を ELISA を用いて検討した. ヒト fibrocyte との共培養によるヒト肺線維芽細胞の fibrocyte 依存性増殖反応について

^3H -チミジン取り込み試験を用いて検討した. Fibrocyte の増殖反応を抑制するために共培養前に fibrocyte に対して放射線を照射した. 同様に放射線を照射したヒト肺線維芽細胞との共培養による fibrocyte の増殖反応も検討した. fibrocyte 依存性ヒト肺線維芽細胞増殖反応に対する各増殖因子の阻害抗体による抑制反応を検討した. Fibrocyte 培養上清刺激後肺線維芽細胞 lysate における α -SMA, コラーゲン1発現をウェスタンブロット法にて検討した. Fibrocyte 培養上清刺激後肺線維芽細胞における α -SMA 発現を各増殖因子の阻害抗体が抑制するか検討した.

結 果

分離された細胞がフローサイトメトリーにて CD3, CD19, CD14 陰性で CD45, CXCR4, CCR7, コラーゲン1陽性であることを確認した(図1A). また免疫染色にて紡錘型の形態を示し, CD45, コラーゲン1ともに陽性であり, fibrocyte が分離されていることを証明した(図1B). ヒト fibrocyte 培養上清中の各種増殖因子濃度を ELISA 法にて測定したところ fibrocyte 培養時間依存性に TGF- β 1, FGF-2, PDGF-BB の発現亢進がみとめられた(図2). またヒト肺線維芽細胞は, fibrocyte との共培養により fibrocyte 濃度(個数)依存性に増殖反応を示した(図3A). その増殖反応は PDGF-BB ならびに FGF-2 の阻害抗体添加により有意に抑制された(図4). 一方で肺線維芽細胞との共培養によっても fibrocyte は増殖反応を示さないことが分かった. また fibrocyte の増殖能は肺線維芽細胞と比較すると非常に低いことが示された(図3B). Fibrocyte 培養上清刺激肺線維芽細胞にて α -SMA, コラーゲン1の発現亢進が確認された(図5). Fibrocyte 培養上清刺激による α -SMA 発現が TGF- β 1 ならびに FGF-2 の阻害抗体添加により抑制された(図6).

考 察

Fibrocyte は TGF- β 1, FGF-2, PDGF-BB などの増殖因子を発現し, 肺線維芽細胞の増殖や筋線維芽細胞への分化を促進しうることを示唆された. Wang らにより熱傷患者末梢血から分離した fibrocyte が健

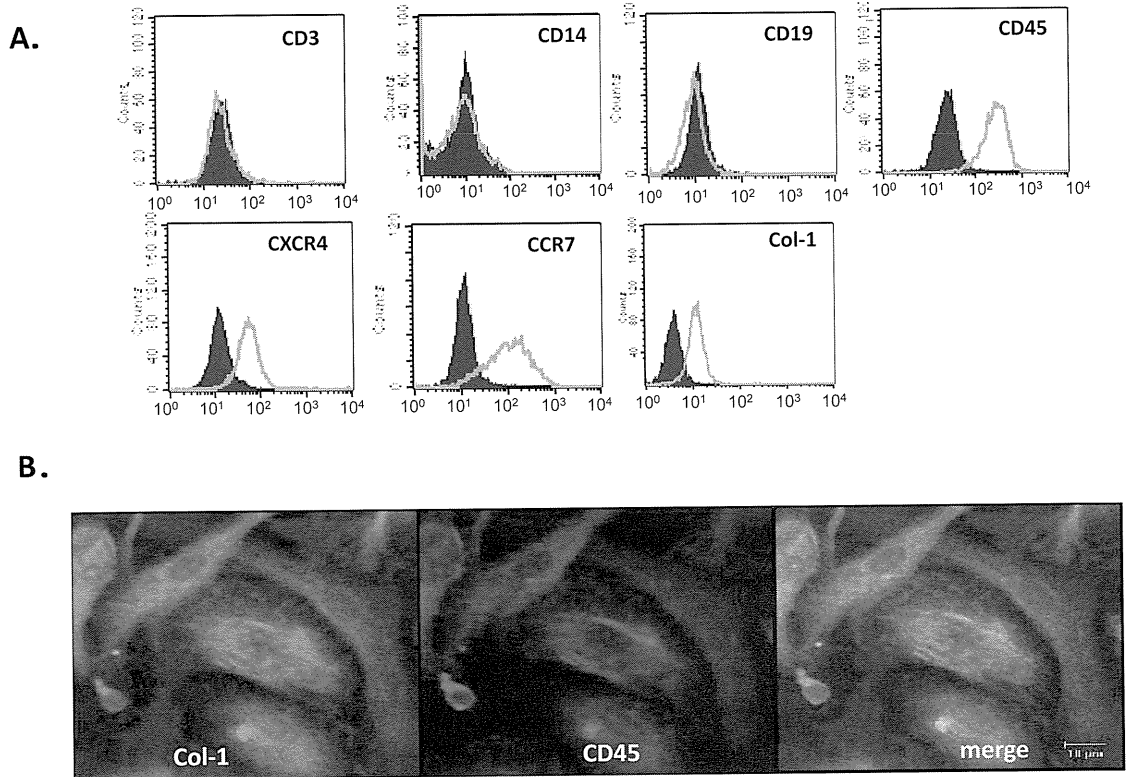


図1. ヒト末梢血より fibrocyte の分離
 A. CD3, CD19, CD14陰性, CD45, CXCR4, CCR7, コラーゲン1陽性であることを確認した. B. 紡錘形を呈しCD45, コラーゲン1ともに陽性を示す fibrocyte であることを証明した.

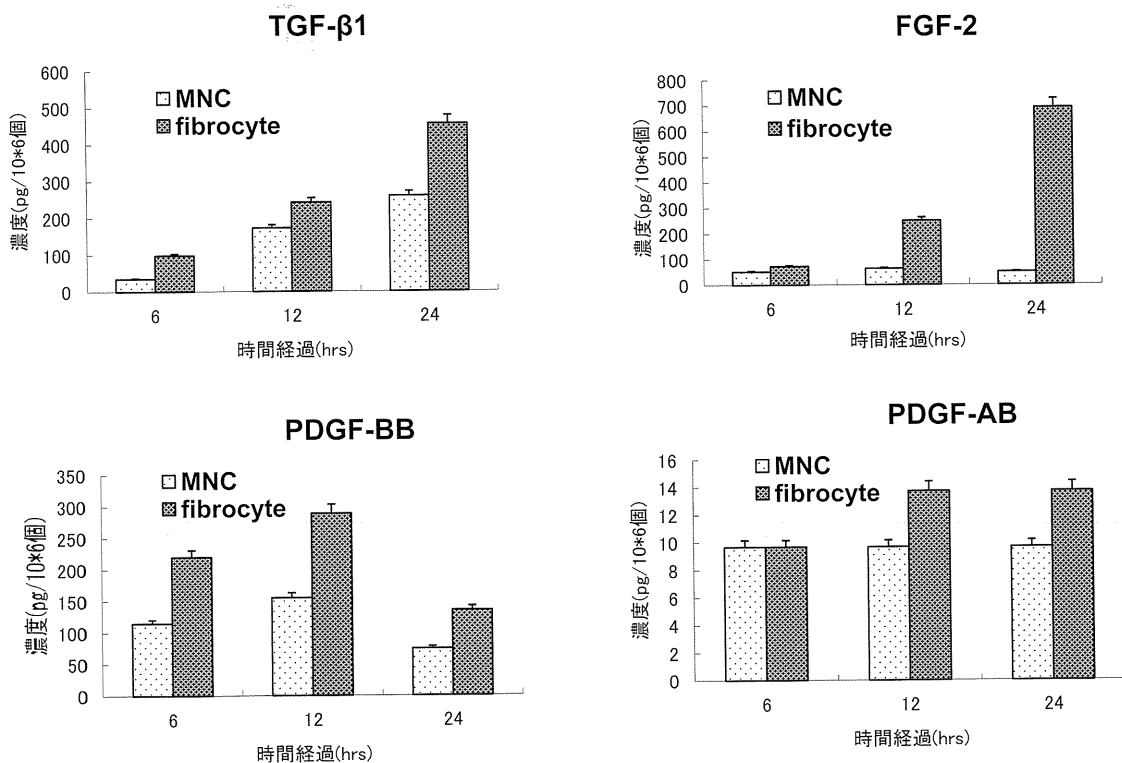


図2. fibrocyte 培養上清中の増殖因子の発現
 Fibrocyte 培養時間依存性に TGF-β1, FGF-2, PDGF-BB の発現亢進がみられた.

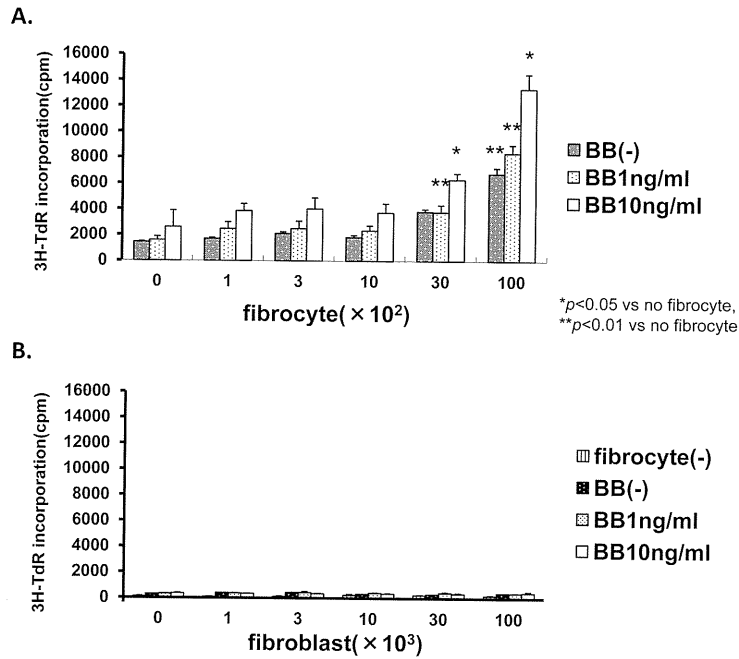


図3. fibrocyte 培養上清刺激によるヒト肺線維芽細胞の増殖反応
 A. fibrocyte 刺激によりその濃度(個数)依存性に肺線維芽細胞が増殖反応を示した。B. 線維芽細胞刺激により fibrocyte は増殖反応を示さなかった。

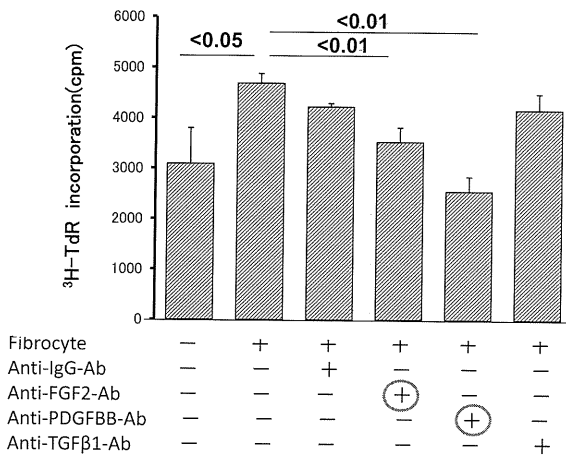


図4. Fibrocyte 共培養によるヒト肺線維芽細胞増殖反応に対するブロッキング抗体を用いた抑制反応の検討
 PDGF-BB, FGF-2の阻害抗体により fibrocyte 依存性線維芽細胞増殖反応が抑制された。

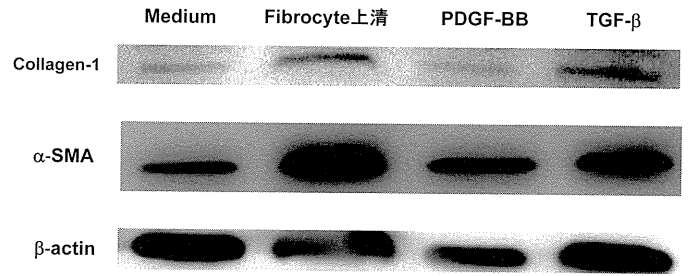


図5. fibrocyte 培養上清刺激によるヒト肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化
 Fibrocyte 培養上清刺激により肺線維芽細胞におけるα-SMAの発現が亢進した。

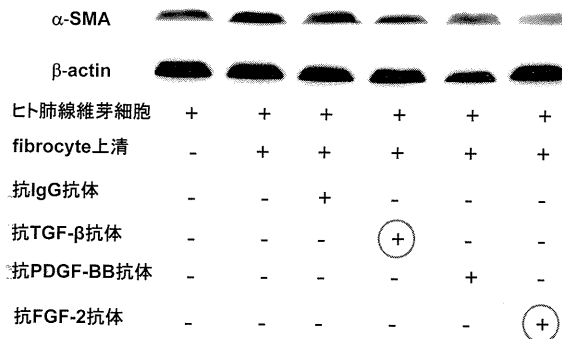


図6. fibrocyte 培養上清刺激によるヒト肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に対するブロッキング抗体を用いた抑制反応の検討
 fibrocyte 培養上清刺激による肺線維芽細胞におけるα-SMA発現をTGF-β1, FGF-2の阻害抗体が抑制した。