

常人由来の fibrocyte と比較し TGF- β , CTGF を産生し線維芽細胞に対し α -SMA 発現を亢進させることが報告されており, 今回の我々の結果と一致する [7]. また fibrocyte の増殖能が非常に低いことから fibrocyte 自身が肺へ遊走後に筋線維芽細胞に分化しコラーゲンなどの ECM を自ら産生し線維化に関わっているというよりは, 肺において肺線維芽細胞の刺激などの二次的な作用により肺線維化に関わっていると考えた. Andersson-Sjoland らにより, 特発性肺線維症患者肺における免疫染色にて fibroblastic foci 周囲に fibrocyte が優位に集族していることが報告されているが, このことは我々の仮説を裏付ける内容である [8]. 以上から fibrocyte は肺において増殖因子産生を介して肺線維芽細胞を刺激し fibroblastic foci の形成に関与し肺線維化を促進していると考えられた.

参考文献

- 1) McNulty, R.J., *Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(4): p. 666-71.
- 2) Strieter, R.M., et al., *The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(5): p. 1111-8.
- 3) Hashimoto, N., et al., *Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2004. **113**(2): p. 243-52.
- 4) Phillips, R.J., et al., *Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis*. J Clin Invest, 2004. **114**(3): p. 438-46.
- 5) Moeller, A., et al., *Circulating fibrocytes are an indicator for poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2009.
- 6) Aono, Y., et al., *SP-D regulates effector cell function and fibrotic lung remodeling in response to bleomycin injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2011.
- 7) Wang, J.F., et al., *Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts*. Wound Repair Regen, 2007. **15**(1): p. 113-21.
- 8) Andersson-Sjoland, A., et al., *Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(10): p. 2129-40.

上皮間葉移行を含むTGFβ誘導線維化病態形成に対するPTENリン酸化部位遺伝子変異を用いた新規治療法の開発

橋本 直純¹ 今泉 和良² 長谷川好規^{1*}

特発性肺線維症は、fibroblastic fociの病理学的特徴を有する。線維化病変における線維芽細胞は多様な表現型を示すことが報告され、我々は、骨髓由来線維芽細胞や微小血管内皮細胞由来線維芽細胞を同定した。特に、epithelial-mesenchymal transition(EMT)は細胞外マトリックスの過剰産生をはじめとする線維化病変形成に極めて重要な病態であることが解明されている。これらの多様な線維芽細胞が形成する線維化病変は、活性化Ras誘導をもたらす増殖因子刺激(Receptor tyrosine kinase; RTK), TGFβ過剰産生, そして低酸素状態をもたらしている。EMT誘導にはこれらの共刺激が重要であることも明らかになっているので、その包括的制御は間質性肺炎の治療戦略上きわめて重要なものとなる。しかしながら、これらを包括的に制御する治療戦略はRTK制御の試みにとどまっている。PTENはEMTを誘導するさまざまな刺激を包括的に制御し得る癌抑制遺伝子であるが、今回我々は、さまざまな線維化誘導刺激がPTEN産生制御およびPTEN C末端部位リン酸化によるPTEN活性低下を誘導することを明らかにした。さらに、PTEN C末端遺伝子変異を導入することによりTGFβ誘導EMTを制御して、それに伴う細胞遊走および細胞増殖を効率的に制御することを明らかにした。これらの知見は、PTEN C末端リン酸化部位の重要性と治療標的になり得ることを示唆する。

The therapeutic impact of mutation of phosphorylation sites in the PTEN C-terminal tail against TGFβ-induced EMT in lung fibrosis

Naozumi Hashimoto¹, Kazuyoshi Imaizumi², Yoshinori Hasegawa¹

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

² Department of Respiratory Medicine and Allergy, Fujita Health University

The pathological hallmark lesions in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) are the fibroblastic foci, in which fibroblasts are thought to be involved as key mediators of matrix deposition. Current evidence suggests that the pathogenesis of pulmonary fibrosis might involve the recruitment of endothelial and alveolar/epithelial cell (AEC)-derived fibroblasts through Epithelial/Endothelial-Mesenchymal Transition (EMT), as well as bone marrow (BM)-derived fibroblasts. Although a central feature of EMT is the cooperation between TGFβ signaling and receptor tyrosine kinase (RTK)-signaling, fibrotic lesions contribute the development of new fibrosis lesion as tissue microenvironment through the supply of many kinds of growth factor signaling, TGFβ stimulation, and hypoxic condition as well. Although various signaling induced by TGFβ and hypoxia in tumor microenvironment are regulated by PTEN, the biological activities of PTEN itself are negatively regulated by phosphorylation in its C-terminal tail. In the present study, our data suggest that mutation of phosphorylation sites in the PTEN C-terminal tail might be a therapeutic target for negatively regulating EMT phenotypes induced by TGFβ from fibrotic microenvironment in lung fibrosis.

はじめに

特発性肺線維症は、fibroblastic fociの病理学的特徴を有する。線維化病変における線維芽細胞は多様な表現型を示すことが報告された。そうした中、我々は肺外起源由来として骨髄由来線維芽細胞の存在を報告した(1)。また、肺内起源由来としてもepithelial-mesenchymal transition(EMT)を介した肺胞上皮由来線維芽細胞の存在も報告された(2)。さらに我々は、endothelial-mesenchymal transition(Endothelial-MT/EMT)を介した微小血管内皮細胞由来線維芽細胞を同定して報告した(3)。EMTは細胞外マトリックスの過剰産生をはじめとする線維化病変形成に極めて重要な病態であり、その制御は間質性肺炎の治療戦略上きわめて重要なものとなる。これらの多様な線維芽細胞が形成する線維化病変は、活性化Ras誘導をもたらす増殖因子刺激(Receptor tyrosine kinase; RTK), TGF β 過剰産生および低酸素状態をもたらしている(4)。今回これらを包括的に制御する治療戦略としてPTENに着目した。近年PTENの生物活性は、PTEN C末端リン酸化部位によるリン酸化により負に制御されていることが明らかにされた(5)。しかしながら、PTEN発現およびPTEN C末端リン酸化部位リン酸化におけるTGF β 刺激の役割は明らかにされていない。また、TGF β 誘導EMT表現型獲得におけるPTEN C末端リン酸化部位の役割は明らかになっていない。今回我々はこれらを明らかにすることを目的とした。

方 法

1) PTEN発現およびPTEN C末端リン酸化部位リン酸化におけるTGF β 刺激の影響

肺胞上皮細胞を用いてTGF β 刺激によるPTEN発現、PTEN C末端リン酸化部位リン酸化、その表現型変化における影響を評価した。

2) TGF β 誘導EMT表現型獲得におけるPTEN C末端リン酸化部位遺伝子変異による制御効果の検討の役割
薬物(Dox)調節型遺伝子導入システムを導入した

肺上皮細胞H358細胞に、薬物(Dox)調節型GFP、GFP-PTENwildおよびGFPPTEN4A(PTEN C末端リン酸化部位遺伝子変異)を導入した後、TGF β 刺激によるEMTを介した表現型変化を検討した。また細胞遊走能と増殖能も合わせて評価した。

結 果

1) 肺上皮細胞において、TGF β 刺激によりPTEN発現抑制とともにPTENリン酸化(p-PTEN)の亢進を認めた。その結果、p-PTEN/PTEN ratioの有意な増加を認めた。TGF β 刺激により肺上皮細胞がE-Cadherinの減弱とFibronectinの増強を伴うEMT表現型獲得、および、遊走の亢進を示すこともあわせて確認した。

2) TGF β 投与Dox非投与肺上皮細胞ではEMTを介したE-Cadherinの減弱とFibronectinの増強を認め、細胞遊走能の亢進を認めた。一方、TGF β 投与Dox投与肺上皮細胞ではGFP-PTEN4A導入細胞株でのみ、細胞遊走能の有意な抑制とEMT表現型誘導が抑制が認められた。TGF β 非投与下においては細胞増殖に有意な差を認めなかったが、TGF β 投与下においてはGFP-PTEN4Aは有意な細胞増殖抑制を示した。

考案・結論

骨髄由来線維芽細胞の関与とともに線維化病変における線維芽細胞の多様性について検討する中で(1)、我々は血管内皮細胞特異的LacZ発現マウスに対して*in vivo* BLM誘導肺線維症モデルを作成して血管内皮細胞由来線維芽細胞の同定を報告した(3)。これらの検討の中で、線維化病変の形成にEMTを介した線維芽細胞への形質転換が重要な一因になっているという知見を得た(3)。

これらの多様な線維芽細胞が形成する線維化病変は、活性化Ras誘導をもたらす増殖因子刺激(Receptor tyrosine kinase; RTK), TGF β 過剰産生および低酸素状態をもたらしていることが知られている(4)。これらが示唆することは一つの刺激を制御するのではなく複合的な制御を目標とした治療戦略が必要であるということである。線維化病変がもたらす複数の刺激を包括的に制御する治療戦略は臨床試験の段階においてもRTK制御の試みのみにとどまっている。

¹ 名古屋大学医学部呼吸器内科

² 藤田保健衛生大学呼吸器内科・アレルギー科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

PTENはEMTを誘導するさまざまな刺激を包括的に制御し得る癌抑制遺伝子であるが、近年間質性肺炎の線維化病変においてPTEN発現抑制の報告がなされた(6)。さらに、腫瘍微小環境下の線維芽細胞におけるPTEN機能低下が腫瘍増殖の直接的な要因になっていることが明らかになった(7)。そうした中、PTENの生物活性がそのC末端側リン酸化部位によって負に制御されていることが報告された(5)。さらに、PTEN C末端リン酸化レベルは、正常B細胞よりも白血病細胞において有意に亢進していることが報告された(8)。しかしながら、間質性肺炎の病態形成の中におけるPTEN C末端リン酸化部位の役割は明らかにされていなかった。

今回我々は、線維化病変から過剰産生および活性が誘導されるTGF β 刺激により、肺上皮細胞は有意なPTEN発現抑制とPTEN C末端リン酸化亢進がもたらされることを明らかにした。これによってp-PTEN/PTEN ratio 亢進が誘導され、結果としてPTENの制御を受けるTGF β 誘導シグナルの活性化亢進がおこる状態になることを明らかにした。そこで、PTEN C末端リン酸化部位のリン酸化阻害がTGF β 誘導EMT表現型獲得および細胞遊走亢進を制御できるかを検討した。PTEN C末端リン酸化部位遺伝子変異PTEN4AはPTEN C末端リン酸化部位のリン酸化を完全に抑制することを確認した。PTEN4A 遺伝子導入はTGF β 誘導細胞遊走およびEMT表現型獲得を完全に抑制した一方、PTENWildの遺伝子導入による制御効果は限定的であった。これらの結果よりPTEN C末端リン酸化部位のリン酸化制御は極めて有用な治療標的となることが示唆された。PTENはそのC末端のリン酸化によりPTENの立体構造変化を受け膜結合能が減弱することが示唆されている。その結果、PTENが有するPhosphatase activityの減弱とPTEN C末端側にあるE-cadherin複合体結合能の低下が推測された。この結果、EMTが誘導されるとともに各種シグナルの亢進がもたらされ、細胞増殖および細胞遊走亢進に至ると考えられる。興味深いことに、TGF β 刺激のない正常状態においてPTEN4A導入は細胞増殖に影響を与えない一方、TGF β 刺激存在する病的状態においてPTEN4A導入は有意に細胞増殖抑制を示すことが確認された。これは正常な環境にある構成細胞には影響を与えず、線維化病変をはじめとする病的部位に

において過剰刺激を適正に制御することを示唆している。標的部位特異性という観点でも、今後創薬作成を念頭に置いたPTEN4Aによる治療戦略に有用な知見と考える。

これらの知見をもとに、我々は肺線維症実験モデルを作成してPTEN4A 遺伝子導入による効果を検証する予定である。肺線維症における線維芽細胞とPTENを標的にしたこれらの課題は極めて有意義なものであり、これらの実験から新たな肺線維症の治療戦略における重要な結果がもたらされると考える。

References

- 1) Hashimoto, N., Jin, H., Liu, T., Chensue, S.W., and Phan, S.H. 2004. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 113:243-252.
- 2) Kim, K.K., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Robillard, L., Galvez, M.G., Brumwell, A.N., Sheppard, D., and Chapman, H.A. 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13180-13185.
- 3) Hashimoto, N., Phan, S.H., Imaizumi, K., Matsuo, M., Nakashima, H., Kawabe, T., Shimokata, K., and Hasegawa, Y. 2010. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43:161-172.
- 4) Gharaee-Kermani, M., Gyetko, M.R., Hu, B., and Phan, S.H. 2007. New insights into the pathogenesis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a potential role for stem cells in the lung parenchyma and implications for therapy. *Pharm Res* 24:819-841.
- 5) Rahdar, M., Inoue, T., Meyer, T., Zhang, J., Vazquez, F., and Devreotes, P.N. 2009. A phosphorylation-dependent intramolecular interaction regulates the membrane association and activity of the tumor suppressor PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:480-485.
- 6) White, E.S., Atrasz, R.G., Hu, B., Phan, S.H., Stambolic, V., Mak, T.W., Hogaboam, C.M., Flaherty, K.R., Martinez, F.J., Kontos, C.D., et al. 2006. Negative regulation of myofibroblast differentiation

by PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on chromosome 10). *Am J Respir Crit Care Med* 173:112-121.

- 7) Trimboli, A.J., Cantemir-Stone, C.Z., Li, F., Wallace, J.A., Merchant, A., Creasap, N., Thompson, J.C., Caserta, E., Wang, H., Chong, J.L., et al. 2009. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary

epithelial tumours. *Nature* 461:1084-1091.

- 8) Silva, A., Yunes, J.A., Cardoso, B.A., Martins, L.R., Jotta, P.Y., Abecasis, M., Nowill, A.E., Leslie, N.R., Cardoso, A.A., and Barata, J.T. 2008. PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest* 118:3762-3774.

BetaglycanはTGF- β の作用抑制を介し肺線維化を抑制する

谷野 功典 王 新濤 福原奈緒子 二階堂雄文
美佐 健一 植松 学 福原 敦朗 佐藤 俊
横内 浩 金沢 賢也 石田 卓 棟方 充*

Betaglycanはコア蛋白や側鎖を介してTGF- β と結合するヘパラン硫酸/コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであり、TGF- β type III receptorとも呼ばれている。細胞表面に発現するが、sheddingを受け可溶型としても存在し、TGF- β の作用を調整していることから肺線維化病態への関与が示唆されるが、その詳細は不明である。そこで、肺線維化におけるbetaglycanの役割を検討するために、まず肺線維芽細胞株WI-38とMRC-5におけるTGF- β 刺激後のtype I collagen, α -SMAの発現やSmad3リン酸化への効果をrecombinant betaglycan co-incubationの有無、siRNAによるbetaglycan knockdownの有無により検討した。また、TGF- β 刺激後の肺線維芽細胞におけるbetaglycanの発現を検討し、更に特発性肺線維症 (IPF) 患者の血清betaglycan濃度を健常者と比較検討した。肺線維芽細胞WI-38, MRC-5においてTGF- β 刺激によるtype I collagen, α -SMA mRNAの発現亢進とSmad3リン酸化亢進は、recombinant betaglycanとTGF- β のco-incubationにより抑制され、siRNAによるbetaglycanのknockdownにより増強された。また、TGF- β 刺激はbetaglycan mRNAの発現を著明に低下させた。更に、IPF患者では健常者と比較し血清betaglycanが著明に低値であった。以上の結果より、betaglycanはTGF- β の作用抑制を介し肺線維化を抑制し、IPFの病態に関与している可能性が示唆される。

Betaglycan Attenuates Pulmonary Fibrosis by Inhibiting TGF- β Signaling

Yoshinori Tanino, Xintao Wang, Naoko Fukuhara, Takefumi Nikaido, Kenichi Misa, Manabu Uematsu, Atsuro Fukuhara, Suguru Sato, Hiroshi Yokouchi, Kenya Kanazawa, Takashi Ishida, Mitsuru Munakata.

Department of Pulmonary Medicine, School of Medicine, Fukushima Medical University

Background: Betaglycan, also known as the type III TGF- β receptor is a transmembrane heparan sulfate/chondroitin sulfate proteoglycan (PG) that plays a critical role in TGF- β signaling. The glycosaminoglycan side chains as well as the core protein of betaglycan have been reported to bind to several proteins including TGF- β . Although these facts suggest the involvement of this PG in the pathogenesis of pulmonary fibrosis, the precise mechanisms whereby betaglycan modulates pulmonary fibrosis have not been clarified. The goal of this study was to determine the role of betaglycan in pulmonary fibrosis.

Methods: We used WI-38 and MRC-5 cells, human lung fibroblasts for these studies. The cells were stimulated with TGF- β (1 ng/ml) with or without co-incubation of recombinant betaglycan (200 ng/ml), or transfection with small interfering RNA for betaglycan (betaglycan siRNA). The expression of type I collagen (COL1A1) and α -smooth muscle actin (SMA) mRNA at 24 hr and the phosphorylation of Smad3 at 15 min were analyzed. Next, the mRNA expression of betaglycan was analyzed after TGF- β stimulation. At last, the serum concentration of betaglycan in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) was measured and compared with healthy subjects.

Results: In WI-38 and MRC cells, TGF- β stimulation upregulated the expression of COL1A1 and α -SMA mRNA at 24 hr and the phosphorylation of Smad3 at 15 min. Co-incubation of recombinant betaglycan inhibited TGF- β -induced upregulation of COL1A1 and α -SMA mRNA and phosphorylation of Smad3. And, addition of betaglycan siRNA increased the expression of COL1A1 and α -SMA mRNA and phosphorylation of Smad3. Moreover, TGF- β stimulation decreased the mRNA level of betaglycan in lung fibroblasts, and the serum concentration of betaglycan in patients with IPF was significantly lower than healthy subjects.

Conclusions: In human lung fibroblasts, both soluble and membrane bound forms of betaglycan inhibit TGF- β -induced upregulation of COL1A1 and α -SMA mRNA through Smad-dependent pathway. And both the soluble and membrane-bound forms of betaglycan are decreased in pulmonary fibrosis. These results suggest that betaglycan is involved in the pathogenesis of pulmonary fibrosis.

はじめに

Betaglycan は、細胞表面に発現するヘパラン硫酸/コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであり、そのコア蛋白またはそのグリコサミノグリカン側鎖を介して TGF-β と結合することが知られ、TGF-β type III receptor とも呼ばれている。細胞表面の betaglycan はそれ自身 signaling receptor ではないが、結合した TGF-β を signaling receptor である type II TGF-β receptor に提示することにより、TGF-β の作用を増強していると考えられている¹⁻³⁾。

一方、betaglycan は protease などによって細胞表面から切断され、細胞表面型のみではなく可溶型 (soluble form) としても存在し⁴⁾、可溶型も TGF-β と結合することによって TGF-β の signal を調整していると考えられているが、betaglycan の生体内の作用については不明な点が多い。TGF-β は、IPF などの肺線維化疾患で重要な役割を果たしていること⁵⁾ から、我々は今回 betaglycan が肺の線維化にどのように関与しているかの検討を行った。

方 法

肺線維芽細胞株 WI-38 と MRC-5 を使用し、まず初めに TGF-β (1 ng/ml) で刺激し、刺激 24 時間後の type I collagen (COL1A1) と α-smooth muscle actin (SMA) の mRNA 発現 (定量的 RT-PCR) と、刺激 15 分後の Smad3 のリン酸化 (Western blotting) を TGF-β 刺激なし (medium only) と比較した。次に、TGF-β 刺激 24 時間後の COL1A1 と α-SMA mRNA の亢進と 15 分後の Smad3 リン酸化亢進に対する betaglycan の役割を検討するために、recombinant betaglycan (200 ng/ml) と TGF-β の co-incubation の有無、または betaglycan siRNA 導入による betaglycan knockdown の有無による効果を検討した。更に、肺線維芽細胞株への TGF-β 刺激の betaglycan mRNA に対する影響を検討し、最後に IPF 患者の血清中 betaglycan 濃度を ELISA 法で測定し、健常者と比較検討した。

※

結 果

肺線維芽細胞株 WI-38 において、TGF-β 刺激により 24 時間後に COL1A1 と α-SMA mRNA の増加が認

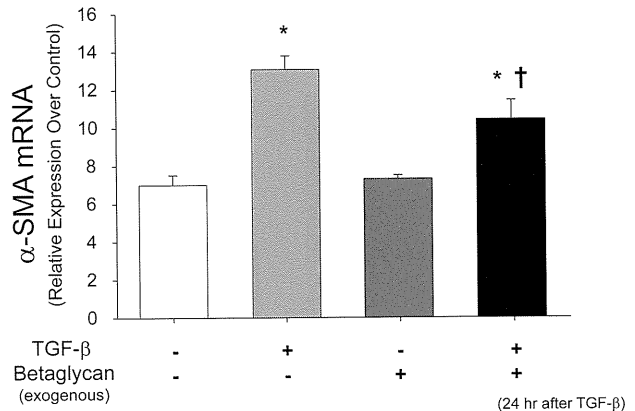


Figure 1. Effect of Betaglycan on α-SMA mRNA Expression in Lung Fibroblasts.

Values are the mean ± SEM with n = 3. * p < 0.05 vs MO (Medium only), † p < 0.05 vs TGF-β

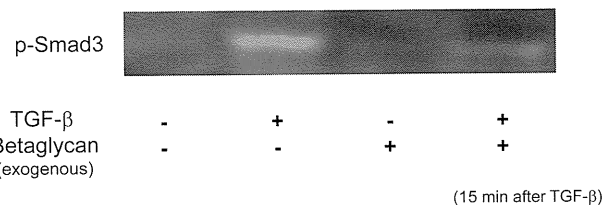


Figure 2. Effect of Betaglycan on Smad3 Phosphorylation in Lung Fibroblasts

められ、刺激 15 分後に Smad3 のリン酸化亢進が認められた (data not shown)。また、TGF-β と recombinant betaglycan の co-incubation は 24 時間後の COL1A1 と α-SMA mRNA の増加を抑制し (Figure 1)、15 分後の Smad3 リン酸化亢進を抑制した (Figure 2)。更に、betaglycan siRNA 導入細胞において TGF-β 刺激 24 時間後の COL1A1 と α-SMA mRNA 発現は、control siRNA 導入細胞より増加しており (Figure 3)、15 分後の Smad3 リン酸化は siRNA 導入細胞において control siRNA 導入細胞より亢進していた。また、betaglycan mRNA は WI-38 細胞において TGF-β 刺激により低下していた (Figure 4)。これらの結果は、MRC-5 細胞においても同様であった。最後に行った IPF 患者の血清中 betaglycan 濃度の検討では、血清 betaglycan は健常者 (n = 23) と比較して IPF 患者 (n = 18) で低値を示した (Figure 5)。

結論と考察

今回、我々は肺線維化における betaglycan の役割を検討した。今回の検討では、betaglycan は肺線維

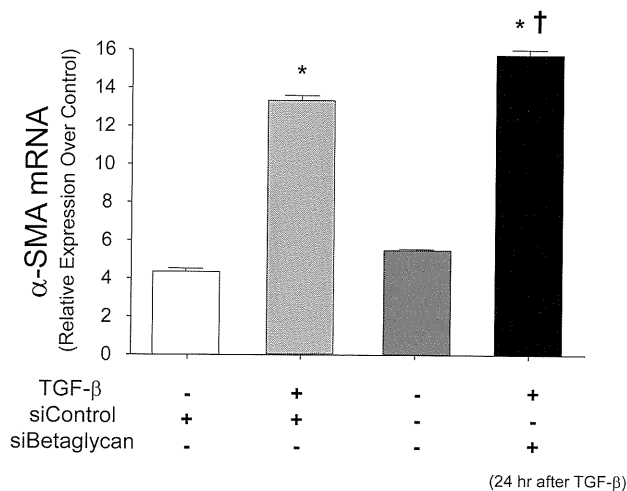


Figure 3. Effect of Betaglycan Knockdown on α -SMA mRNA Expression in Lung Fibroblasts. Values are the mean \pm SEM with $n = 3$. * $p < 0.05$ vs MO (Medium only), † $p < 0.05$ vs TGF- β + siControl.

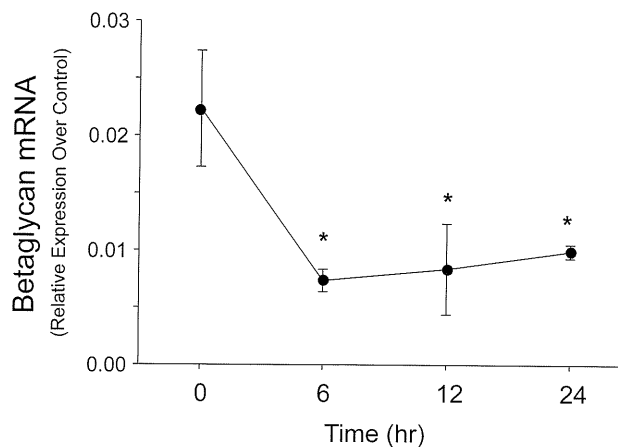


Figure 4. Time Course of Betaglycan mRNA in Lung Fibroblasts after TGF- β . * $p < 0.05$ vs 0 hr.

芽細胞において、TGF- β によるCOL1A1と α -SMAの増加をSmad3のリン酸化抑制を介して、抑制することが示された。また、TGF- β は肺線維芽細胞におけるbetaglycanの発現を低下させ、IPF患者の血清においてもbetaglycanは健常者と比較して低値であったことから、肺線維化の病態へのbetaglycanの関与が示唆される。

Betaglycanは、種々の細胞の細胞表面に発現しているが、plasminやproteaseなどによるsheddingによって可溶型としても存在する⁴⁾。細胞表面のbetaglycan(細胞表面型)は、それ自身では細胞内へのsignal伝達には関わらず、コア蛋白またはグリコサミノグリカン側鎖を介し結合したTGF- β をsignal

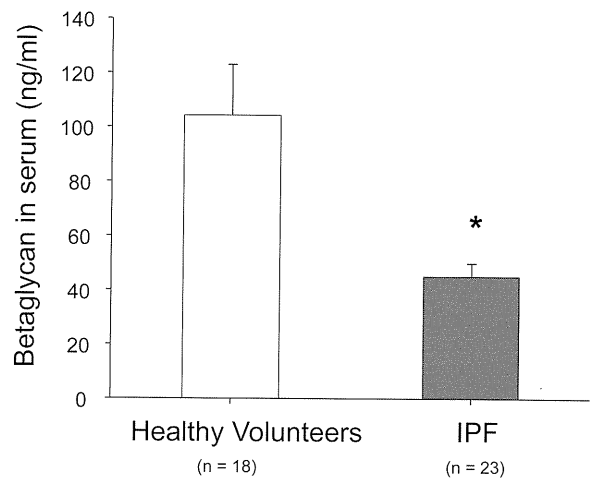


Figure 5. Betaglycan in Serum of Patients with IPF. * $p < 0.05$ vs healthy volunteers.

receptorであるTGF receptor type IIに提示することによりTGF- β の作用を増強していると考えられていた¹⁻³⁾。しかし、本研究ではsiRNAによる細胞型betaglycanのknockdownはTGF- β の作用を亢進していたことから、細胞表面型betaglycanはTGF- β の作用を抑制していると考えられる。実際、近年Ahn JYらはマウス線維芽細胞株NIH3T3細胞にbetaglycanを過剰発現させることによりTGF- β による α -SMA発現増加、Smad2, 3のリン酸化亢進を抑制すること⁶⁾、Criswell TLらはヒト乳ガン細胞株においてbetaglycanをknockdownするとガン細胞のTGF- β に依存した浸潤能が抑制されることを示し⁷⁾、細胞表面型betaglycanがTGF- β 抑制作用を持つことを報告した。また、本研究においてrecombinant betaglycanとTGF- β のco-incubationがTGF- β によるCOL1A1, α -SMAの発現亢進、Smad3リン酸化亢進を抑制したことから、可溶型betaglycanも細胞表面型betaglycanと同様にTGF- β の作用を抑制することが示された。可溶型betaglycanは、これまでの報告でもTGF- β と結合することによりTGF- β の作用を抑制することが報告されており⁸⁾、本研究の結果と合致する。また、これまで、ラット閉塞性細気管支炎モデルへのadenovirusを用いたbetaglycanの気道への過剰発現が気道線維化による閉塞を抑制すること⁹⁾や、db/db糖尿病マウスにおける腎障害・線維化がbetaglycanの腹腔内投与により抑制されたことが報告され¹⁰⁾、本研究におけるTGF- β による肺線維芽細胞でのbetaglycan発現抑制効果と、IPF患者での血清中betaglycan低下の結果よりbetaglycanの肺

線維化病態への関与が強く示唆された。

これらの結果から、IPFなどの肺線維化疾患において betaglycan を投与することが新たな治療法になる可能性があり、今後、更に詳細な検討が必要と考えられる。

参考文献

- 1) López-Casillas F, Wrana JL, Massagué J: Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 1993; 73:1435-44.
- 2) Sankar S, Mahooti-Brooks N, Centrella M et al: Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor beta 2. *J Biol Chem* 1995; 270: 13567-72.
- 3) Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M: The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792:954-73.
- 4) Lamarre J, Vasudevan J, Gonias SL: Plasmin cleaves betaglycan and releases a 60 kDa transforming growth factor-beta complex from the cell surface. *Biochem J* 1994; 302:199-205.
- 5) Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, et al: Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5:155-62.
- 6) Ahn JY, Park S, Yun YS, et al: Inhibition of type III TGF- β receptor aggravates lung fibrotic process. *Biomed Pharmacother.* 2010; 64:472-6.
- 7) Criswell TL, Dumont N, Barnett JV, et al: Knockdown of the transforming growth factor-beta type III receptor impairs motility and invasion of metastatic cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68:7304-12.
- 8) Bandyopadhyay A, Zhu Y, Cibull ML, et al: A soluble transforming growth factor beta type III receptor suppresses tumorigenicity and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Cancer Res* 1999; 59:5041-6.
- 9) Liu M, Suga M, Maclean AA, et al: Soluble transforming growth factor-beta type III receptor gene transfection inhibits fibrous airway obliteration in a rat model of Bronchiolitis obliterans. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:419-23.
- 10) Juárez P, Vilchis-Landeros MM, Ponce-Coria J, et al: Soluble betaglycan reduces renal damage progression in db/db mice. Binding of interleukin-8 to heparan sulfate and chondroitin sulfate in lung tissue. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292:F321-9.

膠原病肺における呼気凝縮液 exhaled breath condensate (EBC) 中の増殖因子測定の意義に関する研究 —肺病変先行型の膠原病を予測できるか—

石井 晴之¹ 皿谷 健¹ 田中 康隆¹ 大林 王司²
山内 康宏³ 幸山 正³ 滝澤 始^{1*}

特発性間質性肺炎には、肺病変先行型の膠原病 collagen vascular diseases (CVD)が潜在している。間質性肺炎 interstitial pneumonia (IP)の診断時にCVDとしての身体所見や血清学的所見が陽性でなければCVD-IPと診断されないが、CVD-IPはidiopathic IPと臨床像が大きく異なる。しかしIP診断時に肺病変先行型CVDを示唆する臨床的特徴は明らかにされていない。

【目的】非侵襲的検査である呼気凝縮液 exhaled breath condensate(EBC)を用いて、CVD-IP症例の特徴的所見を評価し、肺病変先行型の膠原病の予測因子としての有用性を検討すること。

【対象・方法】当院にて診断した間質性肺炎24例(特発性肺線維症12例、膠原病肺8例、膠原病徴候ない自己抗体陽性IP4例)を対象とし、EBC中の増殖因子(VEGF, FGF, HGF, IL-1ra, IL-8, EGF)を測定し血清中のLDH, KL-6, SP-D値との相関性やEBC中の増殖因子同士の相関性を評価した。

【結果】間質性肺炎24例において増殖因子6項目は全て高値を示していたが、各群間での有意差はなかった。またEBC中の増殖因子6項目と血清マーカー3項目では臨床的意義のある有意な相関をみとめるものはなかった。しかし増殖因子間にてIPF群ではVEGFの相関(0.899)、HGFとEGFの相関(0.482)、IL-8とEGFの相関(0.86)に、そしてCVD-IP群ではVEGFとFGFの相関(0.906)、VEGFとEGFの相関(0.717)、FGFとEGFの相関(0.735)に有意差をみとめた。

【結論】EBC中の増殖因子は下気道の局所炎症を反映している可能性が考えられた。またEBC中の増殖因子同士の相関性はIPF群とCVD-IP群でパターンが異なり、この回帰直線によりIPFに潜在する肺病変先行型の膠原病を予測できる可能性が示唆され、今後間質性肺炎の診療においてEBCの有用性を期待できる結果と考えられた。

¹ 杏林大学医学部付属病院呼吸器内科

² 帝京大学医学部付属溝口病院第四内科

³ 東京大学医学部付属病院呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

A. 研究目的

特発性間質性肺炎には、肺病変先行型の膠原病 collagen vascular diseases (CVD) が潜在している。間質性肺炎 interstitial pneumonia (IP) の診断時に CVD としての身体所見や血清学的所見が陽性でなければ CVD-IP と診断されないが、CVD-IP は idiopathic IP と臨床像が大きく異なる。しかし IP 診断時に肺病変先行型 CVD を示唆する臨床的特徴は明らかにされていない。

我々は肺局所の病態を臨床的に把握するための検査として非侵襲的な呼気凝縮液 (exhaled breath condensate: EBC) に注目し、これまでも idiopathic IP で健常者よりも増殖因子やサイトカインの異常高値をみとめることを明らかにしてきた。この EBC は気道被覆液の一部が呼気と共に回収され、肺末梢の変化を反映するものとして注目されている。一般的に下気道や肺泡領域における炎症を評価するためには、剖検肺もしくは胸腔鏡下肺生検や気管支鏡下肺生検など極めて専門性の高い侵襲的検査が要求される。それに対し、EBC は非侵襲的で繰り返し検査することが容易である。しかし現在、IP 診療において EBC の臨床的意義は明らかにされていない。

今回、我々は EBC を用いて膠原病肺 (CVD-IP) および特発性肺線維症 (idiopathic IP) の特徴的所見を評価し、さらには肺病変先行型 CVD-IP の予測因子としての有用性を研究した。

B. 研究方法

2011 年 4 月から 12 月までに杏林大学医学部付属病院に受診され、臨床的に間質性肺炎と診断された 20 歳以上 85 歳以下で本研究に同意を得られた 24 例 (特発性肺線維症 12 例、膠原病肺 8 例、膠原病徴候ない自己抗体陽性 IP 4 例) を対象とし、明らかな急性呼吸器感染症の合併例や重篤な心疾患・肝疾患・腎疾患などにより主治医が試験実施上の問題がある例などは除外した。また同意が得られた健常者 10 例を比較対象とした。全体症例において EBC 中の増殖因子 (VEGF, FGF, HGF, IL-1receptor antagonist: IL-1ra, IL-8, EGF) を測定し、血清中の KL-6, SP-D, LDH 値との相関性や増殖因子間での相関性を各群間で評価した。特発性肺線維症は厚生労働省特定疾患調査

研究班診断と治療の手引き 2011 の診断基準をもとにした臨床診断例である。

EBC は R-tube kit (Respiratory Research Co, Charlottesville, VA) を用いて安静自発呼吸下 5 分間で 1ml 以上を採取したものを検体とした。

また EBC 中の増殖因子は、従来の ELISA の検出下限濃度より、 $10^{-1} \sim 10^{-2}$ の濃度まで検出可能な MUSTag 法 (Synthera Technologies, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

胸部高分解 CT 所見は大動脈弓部、肺門部、肺静脈の高さで、左右の計 6 スライスにおける拡がり (面積比) の合計を ground glass opacity (GGO) と honeycombing について評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は「ヘルシンキ宣言」および「臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年 7 月 31 日全部改正)」を遵守して実施され、参加者の意思により決定され、十分なインフォームド Consent のもとに行った。杏林大学医学部倫理委員会にて承認されている。

C. 研究結果

特発性肺線維症 (IPF) 12 例、膠原病肺 (CVD-IP) 8 例、膠原病徴候ない自己抗体陽性 IP (ANA-IP) 4 例の臨床像を (表 1), (表 2) に示す。各群の平均年齢は IPF 群 74.1 ± 43.8 , CVD-IP 73.0 ± 4.2 , ANA-IP 78.5 ± 4.2 歳と有意差なく、男/女比はそれぞれ 8/4, 4/4, 2/2 であった。また厚生労働省特定疾患調査研究班診断と治療の手引き 2011 による IP 重症度 (I / II / III / IV) はそれぞれ 9/3/0/0, 2/4/1/1, 3/0/0/1 と軽症例が主体であった。CVD-IP は関節リウマチ 3 例、シェーグレン症候群 2 例 (うち 1 例は RA に併発)、多発性筋炎/皮膚筋炎 2 例、全身性強皮症 1 例、ANCA 関連血管炎 (MPA) 1 例の基礎疾患を有していた。血清中の LDH 値 (193.4 ± 25.4 , 289 ± 55.8 , 277.7 ± 89.6), KL-6 値 (892.6 ± 464.6 , 784 ± 458.2 , 945.7 ± 379.1), SP-D 値 (255 ± 155.6 , 65.4 ± 39.6 , 204.2 ± 70.1) は各群間に有意差はみとめなかった。肺機能検査では軽度拡散能障害をみとめるのみで各群とも換気障害は呈していない軽症例が主体であった。胸部高分解能 CT 所見では IPF 群では CVD-IP や ANA-IP 群に比して GGO score が低く honeycombing score が高い傾向をみとめたが有意差はみられていなかった。

表1: Characteristics

	Healthy control n=10	IPF n=12	CVD-IP n=8	Sero(+)-IP n=4
Age (mean±SD)	35.83±4.31	74.11±43.86	73.0±4.24	78.75±4.27
M/F	10/0	8/4	4/4	2/2
Smoking (Never/Ex/Current)	10/0/0	5/7/0	3/5/0	1/3/0
Hugh-Jones (I/II/III/IV/V)	N.A	1/6/5/0/0	0/4//3/1/0	0/2/2/0/0
IP severity (I/II/III/IV)	N.A	9/3/0/0	2/4/1/1	3/0/0/1
Collagen Vascular Disease	None	None	(+)	None
RA			3	
SSC			1	
Sjogren			2	
others			3	

表2: Characteristics

	Healthy control n=10	IPF n=12	CVD-IP n=8	Sero(+)-IP n=4
<Serum marker>	N.A			
LDH (IU/l)		193.4±25.4	289±55.8	277.7±89.6
KL-6 (U/ml)		892.6±464.6	784±458.2	945.7±379.1
SP-D (ng/ml)		225±155.6	65.4±39.6	204.2±70.1
<Pulmonary function>	N.A			
FVC (L)		2.31±0.49	2.02±0.11	2.04±0.44
FEV1.0 (L)		1.87±0.37	1.74±0.35	1.61±0.33
FEV1.0% (%)		82.4±10.1	85.8±12.72	79.1±4.09
Dlco (ml/min/torr)		8.94±2.91	8.42±3.08	7.35±1.78
<CT findings>	N.A			
GGO score		9.55±3.35	12.5±9.19	16.33±1.15
Honeycomb score		4.33±6.16	3.25±4.92	1±1

(EBC 中の増殖因子)

EBC 中の増殖因子(VEGF, FGF, HGF, IL-1ra, IL-8, EGH)は全て健常者よりも IP 群(IPF, CVD-IP, ANA-IP 全例)において有意に高値を示していた(図1)。IP 群での各増殖因子の数値(median:95%CI)はそれぞれ VEGF 4.51(3.58-5.45)pg/ml, FGF 21.98(16.6-27.37)pg/ml, HGF 92.61(65.98-119.22)pg/ml, IL-1ra 2.87(2.05-3.7)pg/ml, IL-8 2.05(1.32-2.71)pg/ml, EGF 0.3(0.09-0.51)pg/ml であった。IPF, CVD-IP, ANA-IP の各群共に VEGF, FGF, HGF, IL-1ra, IL-8, EGF 値は全て健常者より高値であったが、各群間での有意差はみられ

なかった(図2)。

(EBC 中の増殖因子と血清マーカー)

EBC 中の増殖因子(VEGF, FGF, HGF, IL-1ra, IL-8, EGH)と血清マーカー(LDH, KL-6, SP-D)との相関は、IP(IPF, CVD-IP, ANA-IP)24例全体で LDH と IL-1ra との間のみ正の相関(0.415)をみとめた(図3)。しかし IPF 群では有意な相関をみとめたものはなく、CVD-IP 群では IL-8 と KL-6 との間で負の相関(-0.745)をみとめた(図4)。

(EBC 中の増殖因子間での相関)

IP(IPF, CVD-IP, ANA-IP)24例全体において EBC 中

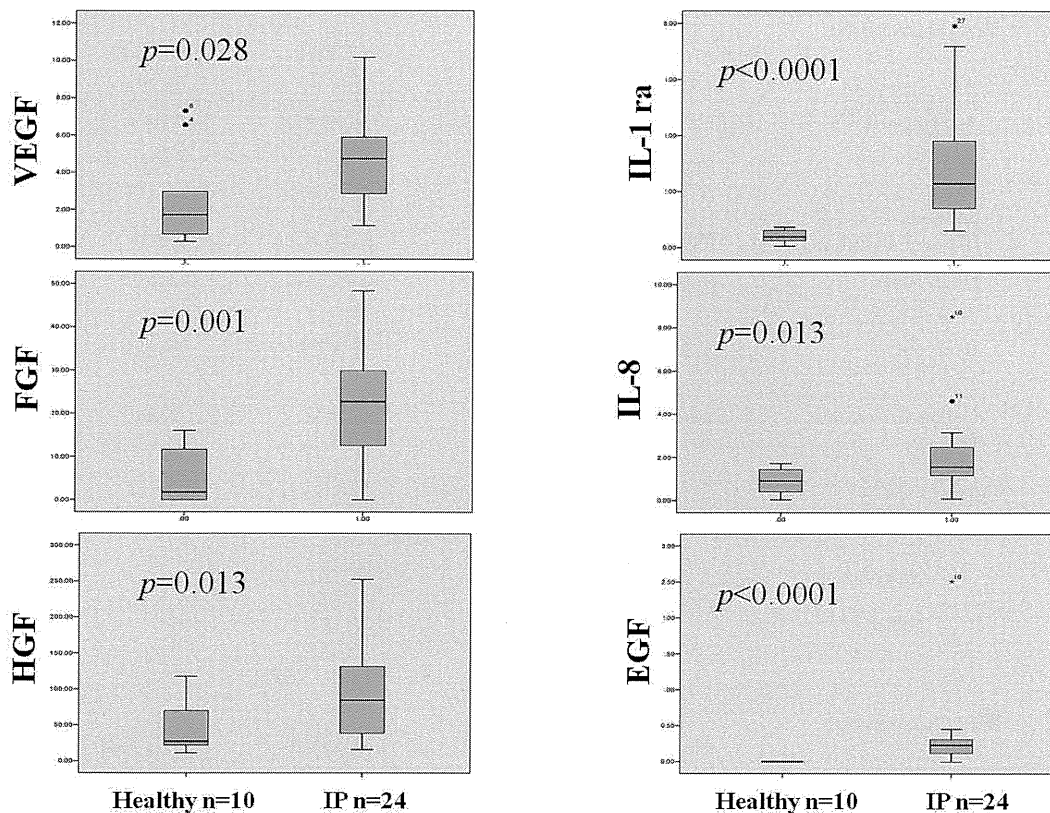


図1: EBC中の増殖因子(健常者とIP群との比較)

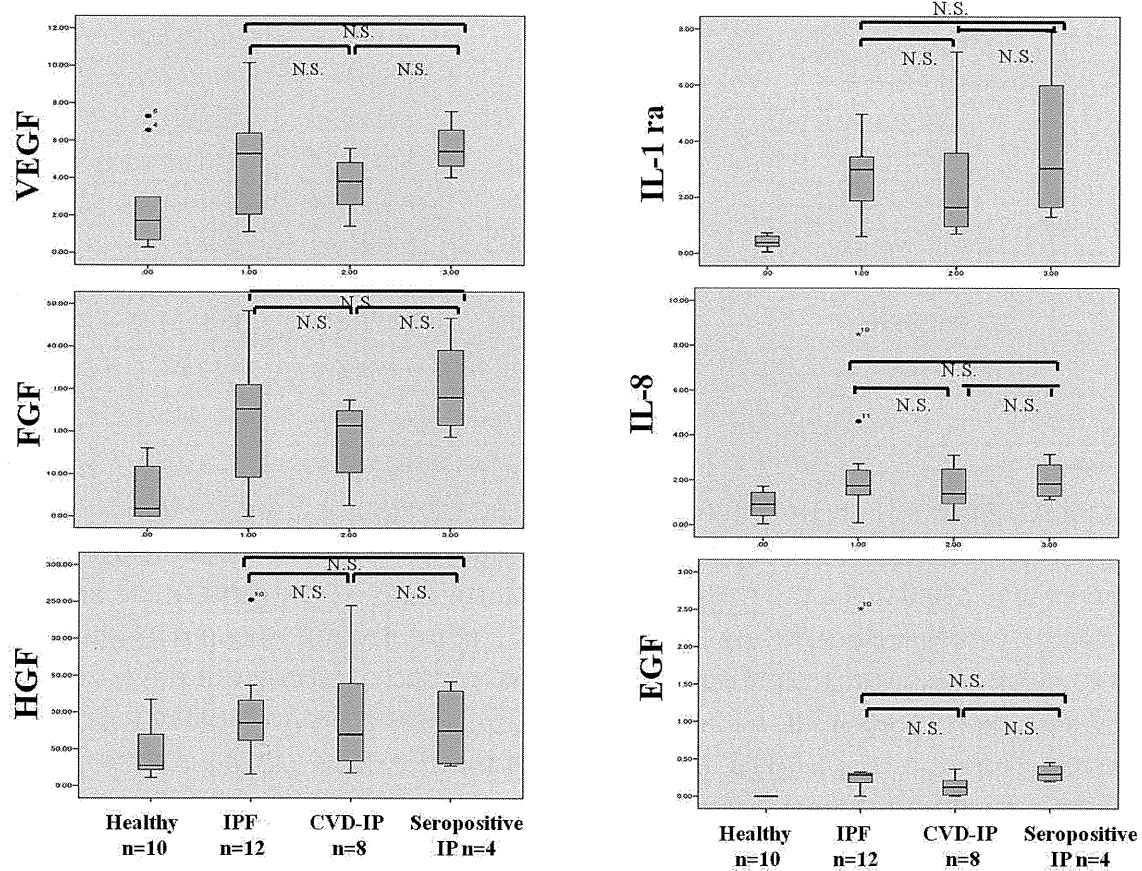


図2: EBC中の増殖因子(各群間での比較)

(IP case n=24)

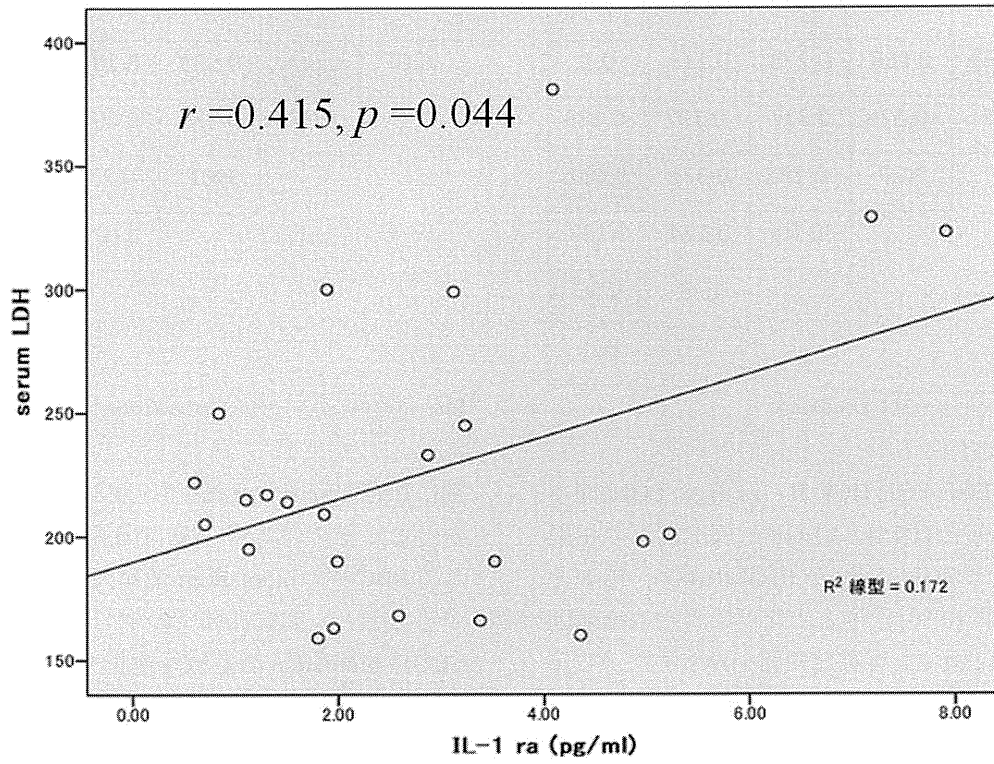


図3: EBC中のIL-1 receptor antagonistと血清LDHの相関

(CVD-IP case n=8)

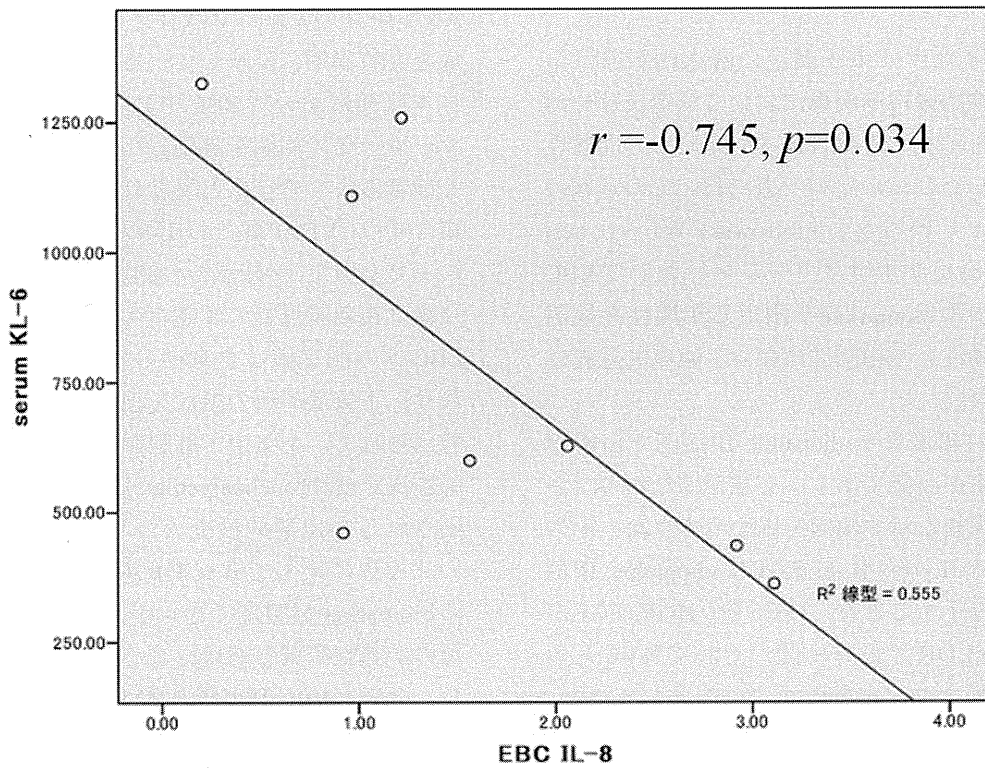


図4: EBC中のIL-8と血清KL-6の相関

IP case n=24

	FGF	HGF	IL-1ra	IL-8	EGF
VEGF	0.899	0.058	0.278	0.113	0.1
FGF		-0.176	0.317	-0.192	-0.189
HGF			-0.183	0.372	0.482
IL-1ra				0.124	0.183
IL-8					0.86
EGF					

図5: EBC中の各マーカー間での相関係数

の増殖因子(VEGF, FGF, HGF, IL-1ra, IL-8, EGF)間での相関を評価した(図5)。VEGFとFGFに正の相関(0.899), HGFとEGFに正の相関(0.482), IL-8とEGFに正の相関(0.86)をみとめた。これらの増殖因子間はIPF群12例でも有意な相関をみとめた。しかしCDV-IP群8例では有意な相関をみとめたものはVEGFとFGFに正の相関(0.906), VEGFとEGFに正の相関(0.717), FGFとEGFに正の相関(0.735)と異なる組み合わせのものであった(図6)。

D. 考察

EBC中のバイオマーカー測定の臨床的意義は気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患において気道炎症や病勢との関連性を示唆する報告が多い。しかし間質性肺炎を中心としたびまん性肺疾患における意義は明らかにされていない。Piotrowski WJら(Chest 2007;132;589-96)がサルコイドーシスにおいてEBCおよびBALF中のbiomarkerを測定し相関性を検討しているが活動性との相関性はなく、臨床的意義は明記されていない。

我々は平成21年度より idiopathic IP症例でEBC中の増殖因子測定が可能であり、有意差はなかったが健常者よりも高値を示す傾向を確かめてきた。その中でもEBC中のIL-1ra, IL-8, EGFはidiopathic IP例で著しく高値を示すことや、EBC中のHGF, FGFが血清中のKL-6,LDHと正の相関、そして%VCと負の相関をみとめたことを前年までに報告してきた。しかしこれまでの研究報告ではEBC中のbiomarker測定が血清マーカー、肺機能、そして画像所見とは

CVD-IP case n=8

	FGF	HGF	IL-1ra	IL-8	EGF
VEGF	0.906	0.535	0.183	0.384	0.717
FGF		0.321	0.295	0.027	0.735
HGF			-0.274	0.301	-0.157
IL-1ra				0.058	0.494
IL-8					0.285
EGF					

図6: EBC中の各マーカー間での相関係数

別に独自の臨床的意義をもつのかは検討できていなかった。そのため今年度は対象症例を24例に増加してEBC中のbiomarker(増殖因子)測定値を再確認することと、間質性肺炎の中でもIPFと膠原病肺のEBC中biomarker測定値を解析することで診断学的な臨床的意義を検討した。

今回の研究対象者24例のIP群でもEBC中のVEGF, FGF, HGF, IL-1ra, IL-8, EGFは全て健常者よりも高値を示しており、びまん性肺疾患においても下気道の炎症を非侵襲的検査であるEBCで確認できる重要な結果であった。またIPF群, CVD-IP群, ANA-IP群の3群間では有意差がなく、下気道の炎症を非特異的に反映していると思われる。

本研究においてEBC中の増殖因子測定値と血清マーカーとの相関を評価したが、対象者が少なかった前年度までの結果と異なり有意な相関をみとめた組合せはCVD-IP群でのIL-8とKL-6との相関(-0.745)のみであった。一時点での測定値による評価のため、今後は複数時点での評価をする必要がある。しかしEBC中の測定値は全身性の炎症性マーカーとは異なり、下気道局所の炎症を独自に反映する可能性も考えられた。下気道・肺泡領域の局所炎症は気管支肺泡洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid: BALF)で評価されるが侵襲的検査のため容易には施行できない。それに比して非侵襲的検査であるEBCで複数のbiomarkerが測定できたが、気道病変による数値なのか肺泡領域の病変による数値なのかは不明である。今後はEBC測定値とBALF測定値との相関性も同時に検討する必要がある。

EBC測定値は全身性炎症マーカーと明らかな相

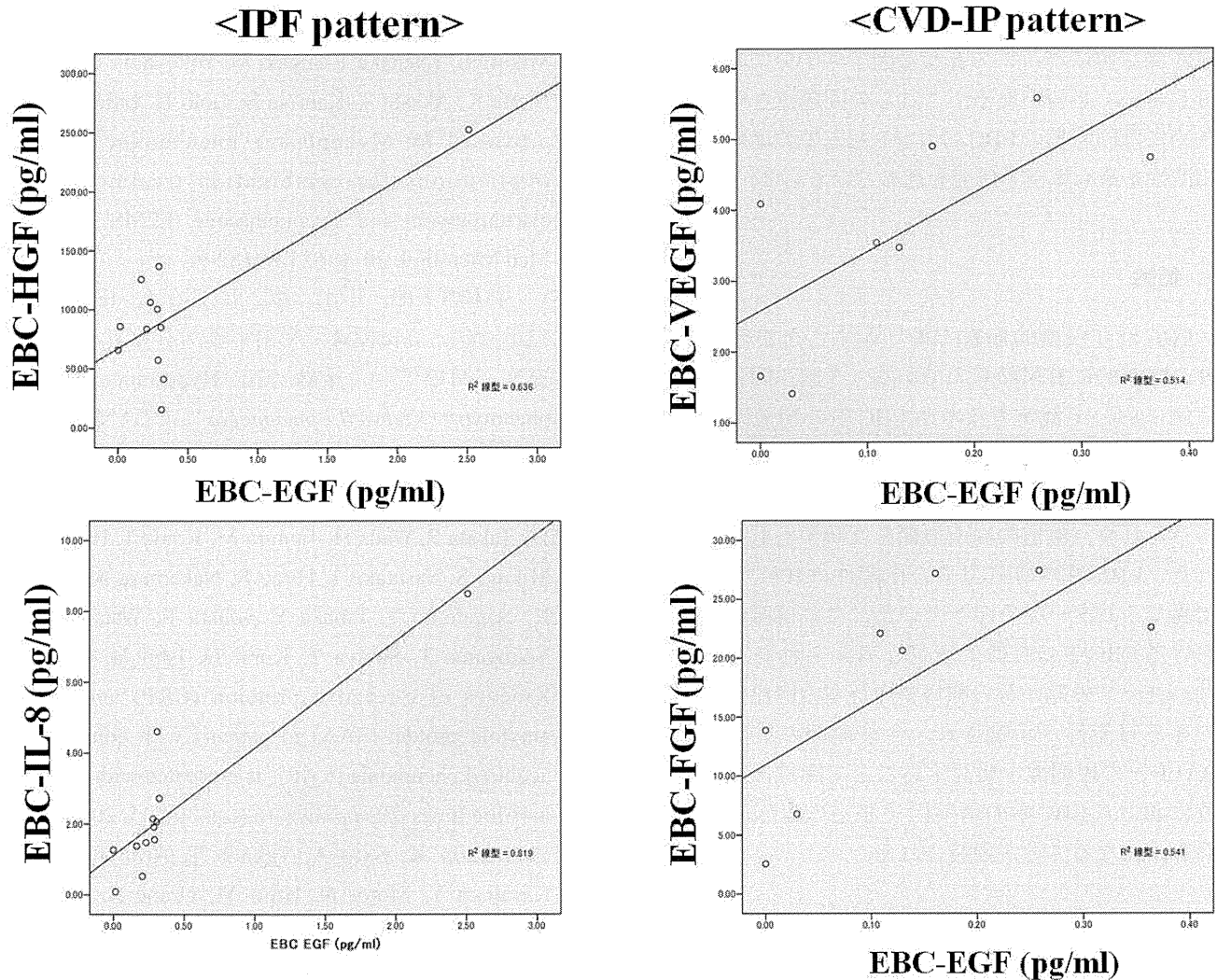


図7: EBC 中の増殖因子間での相関図

関をみとめなかった。EBC 中の測定値が下気道の局所を反映するのであれば、局所からの情報として EBC 測定値同士の関連性を評価する必要がある。本研究の結果から IPF 群と CVD-IP 群では有意な相関をみとめる組合せが異なっていた。両群とも VEGF と FGF に正の相関をみとめるのは一致しているが、IPF 群では HGF と EGF、IL-8 と EGF にも相関をみとめたのに対し、CVD-IP 群では VEGF と EGF、FGF と EGF に相関をみとめていた。これは各群での EBC における特徴的所見と考えられる。

この有意な相関をみとめた IPF 群パターン (HGF-EGF、IL-8-EGF) と CVD-IP 群パターン (VEGF-EGF、FGF-EGF) の回帰直線 (図7) を描出し、IPF に潜在的肺病変先行型の膠原病を EBC 測定値から予測できる可能性を考えてみた。本研究にて膠原病の徴候なく自己抗体陽性の IP は 4 例登録していた。この 4

例の EBC 測定値を IPF 群パターンと CVD-IP 群パターンのどちらの回帰直線に近似するかを検討した。4 例中 2 例は IPF 群パターンに近似し、1 例は CVD-IP 群パターン、もうひとつは両パターンに近似していた。この CVD-IP 群パターンに近似した症例を中心に 4 例全例で、今後膠原病発症の有無を経過観察していく方針である。

本研究における重要な課題は EBC という検体自体の評価である。EBC は呼気時に下気道の分岐部で乱流が発生し、エアロゾル化した気道被覆液を回収したものである。この乱流は気道内径に比して気流速度が速いほど発生しやすい。通常、末梢下気道では気道の断面積の総和が非常に大きくなり気流速度は低下するため、乱流よりも層流となる。そのため EBC は末梢下気道や肺泡領域の情報を反映していない可能性も考えなければならない。また喫煙・

粉塵吸入の影響や潜在するアレルギー性疾患などEBC測定値にバイアスとなる因子も十分に考慮し解析していく必要がある。これらの問題点を解決するためには同時期のEBCおよびBALF中の増殖因子の相関性を最も重視し研究を進めていく必要がある。

E. 結論

EBCは非侵襲的検査で繰り返すことが容易であり、臨床的に有用なものである。今回、間質性肺炎症例において健常者よりもEBC中の増殖因子は明らかに高値を示しており、EBC中の増殖因子を測定する意義はある。全身性の炎症マーカーとも相関がみられず、気道の局所炎症を反映するものと思われた。EBC中の増殖因子の相関性はIPFとCVD-IPで異なるパターンを示していた。これは膠原病肺におけるEBC中の特徴的所見と考えられた。この相関パターンの違いから肺病変先行型の膠原病を予測できる可能性が示唆され、今後症例の集積およびBALFとの相関性を検討することで間質性肺炎の診療におけるEBC中の増殖因子測定の臨床的意義が明らかになることが期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 石井晴之, 川島正裕, 益田公彦, 赤川志のぶ. 発熱と急速に進展する空洞性病変を呈した80歳の男性.(誌上セミナー)呼吸30(4); 2011: 399-404.
- 2) 小出 卓, 皿谷 健, 中本啓太郎, 中島 明, 石井晴之, 藤原正親, 柴田英克, 岡 輝明, 呉屋朝幸, 後藤 元. 胸腔鏡下肺生検で類上皮細胞性肉芽腫を認めたメシル酸イマチニブの薬剤性肺障害の1例. 日本呼吸器学会雑誌49(6); 2011: 465-471.
- 3) Mikura S, Wada H, Higaki M, Yasutake T, Ishii H, Kamiya S, Goto H. Erythromycin prevents the pulmonary inflammation induced by exposure to cigarette smoke. Transl Res. 2011; 158(1): 30-37

4) Hirao S, Wada H, Nakagaki K, Saraya T, Kurai D, Mikura S, Yasutake T, Higaki M, Yokoyama T, Ishii H, Nkata K, Akashi T, Kamiya S, Goto H. Inflammation provoked by Mycoplasma pneumoniae extract: implications for combination treatment with clarithromycin and dexamethasone. FEMS Immunol Med Microbiol. 2011; 62(2): 182-9.

5) 中本啓太郎, 小出 卓, 長友禎子, 田村仁樹, 桧垣 学, 高田佐織, 和田裕雄, 石井晴之, 岡崎充宏, 高橋信一, 後藤 元. Hypermucoviscosity phenotypの*Klebsiella pneumonia*による肝膿瘍・敗血症性肺塞栓症の重症例. 日本感染症学会雑誌2011; 85(4): 366-269

6) Takata S, Wada H, Tamura M, Koide T, Higaki M, Mikura S, Yasutake T, Hirao S, Nakamura M, Honda K, Nagatomo T, Tanaka Y, Sohara E, Watanabe M, Yokoyama T, Saraya T, Kurai D, Ishii H, Goto H. Kinetics of c-reactive protein (CRP) and serum amyloid protein (SAA) in patients with community-acquired pneumonia (CAP), as presented with biologic half-life times. *Biomarkers* 16(6):530-535, 2011

7) Ohashi K, Sato A, Takada T, Arai T, Nei T, Kasahara Y, Motoi N, Hojo M, Urano S, Ishii H, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Nasahara Y, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Kanazawa H, Ebina M, Yamaguchi E, Kirchner J, Inoue Y, Nakata K, Tazawa R. Direct evidence that GM-CSF inhalation improves lung clearance in pulmonary alveolar proteinosis. *Respiratory Medicine* 106:284-93, 2012

8) 石井晴之. 肺胞蛋白症:最新の知見. 呼吸器内科20(5): 430-438, 2011

9) 田村仁樹, 渡辺雅人, 石井晴之. Procalcitoninの臨床的意義. Ann Review 2012 呼吸器: 150-155, 2012

10) Kamitani S, Yamauchi Y, Kawasaki S, Takami K, Takizawa H, Nagase T, Kohyama T. Simultaneous stimulation with TGF- β 1 and TNF- α induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells. Int Arch Allergy Immunol. 2011;155(2):119-28.

2. 学会発表

- 1) H. Ishii, K. Nakata. Clinical features of secondary pulmonary alveolar proteinosis complicated with

myelodysplastic syndrome in Japan. The 2nd Japanese Society of Hematology International Symposium 2011; Poster session: Nagasaki in Japan, April 23, 2011.

- 2) H. Ishii, K. Nakata, R. Tazawa, et al. Clinical features of secondary pulmonary alveolar proteinosis complicated with myelodysplastic syndrome in Japan. American Thoracic Society 2011 International Conference; Poster session: Denver, May 16, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

肺傷害における survivin の役割

Role of Survivin on Lung Injury

寺崎 泰弘 寺崎 美佳 永坂 真也 漆山 博和 高橋美紀子
功刀しのぶ 若松 恭子 石川吾利美 桑原 尚美 福田 悠*

目的:Survivinはアポトーシス抑制と細胞分裂制御の2つの機能をもち胎生期や悪性腫瘍にて高発現であるため細胞増殖・生存に重要な因子と考えられている。肺傷害病態には上皮のアポトーシスと再生が重要であるため、マウスブレオマイシン肺傷害モデル、ヒト肺傷害組織およびヒト培養肺上皮細胞を用い肺傷害における本因子の作用について検討した。方法、結果:マウスブレオマイシン傷害肺ではreal time RT-qPCR解析にてsurvivin mRNAの発現量の増加を認めた。免疫組織化学でもSmac/DIABLOやPCNA陽性の傷害され反応性に増生する気道と肺胞の上皮の核や細胞質にsurvivinの高発現を認めた。ヒトびまん性肺胞傷害の反応上皮にもsurvivinの高発現を認めた。培養ヒト肺上皮細胞をブレオマイシンで処理するとsurvivinの発現増加がみられた。活性型のcaspase 3, 7, PARPやPI陽性死細胞数の解析よりsiRNAにて培養ヒト肺上皮細胞のsurvivinの発現を抑制すると高濃度ブレオマイシンによるcaspase活性がより増強し細胞死が助長された。逆に遺伝子導入してsurvivinの過剰発現をおこすと高濃度ブレオマイシンによるcaspase活性がより減弱し細胞死が抑制された。まとめ:悪性腫瘍のみならず肺傷害の病態においてアポトーシス抑制および再生過程にsurvivinが関与している可能性が示唆された。