

1&2). また, *in vitro*においては, 初代培養AEC IIを用いて, ブレオマイシン刺激がIL-6の発現誘導を促し, その内因性IL-6がAEC II内でPI3K-Aktシグナルを惹起し, 細胞死を抑制している可能性を示した(図3&4). また一方で, 外因性にIL-6をAEC IIに添加すると, 意外なことにアポトーシスが惹起された(図5). このAEC IIの細胞死に対するIL-6の相反する2つの作用は興味深いものの, その明確な理由は現時点では得られていない. しかしながら, 本研究において示した, ブレオマイシンによるアポトーシスシグナル(活性型caspase3の検出)がSODで抑制される事実(図4B)は, 間質性肺炎の発症と増悪に関与する活性酸素が, ブレオマイシン適用細胞内で産生される報告¹³⁾を裏付けるものであると同時に, ブレオマイシンによって発現誘導された内因性IL-6がAEC IIに作用する際には, 並行して起こる活性酸素の産生などにより細胞環境に変化が生じていることを示唆している. すなわち, 外因性IL-6をAEC IIに添加する際の条件とは, かなり異なることを意味する. このような細胞環境の変化が, IL-6による細胞出力のベクトルを決める一要素になりうることは充分考えられる. ブレオマイシンの肺内寿命についてはかなり短いことが知られている¹⁴⁾. 一方, 肺胞内IL-6の回収はブレオマイシン投与後1週間後にも検出される(data not shown)ため, *in vitro*のみならず*in vivo*においても, 時間軸の変化に応じてIL-6がAEC IIに対して相反する影響を与える可能性は否定できない. そこで, 今後, 生体内でIL-6が肺胞上皮細胞のfateに対して, どのように働くかさらに研究をすすめていく予定である.

結 論

ブレオマイシン投与急性期において, AEC IIから産生されたIL-6がAEC II自身に影響し細胞死から保護する働きを演じることを確認した. 一方, IL-6はAEC IIの細胞死を惹起する機能も有することを示した. 以上より, 肺線維症の病態成立の起点となりうるAEC IIのfateを握るkey moleculeとして, IL-6が機能する可能性が示唆された.

引用文献

- 1) Kapanci Y, Weibel ER, Kaplan HP, et al. : Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. II. Ultrastructural and morphometric studies. *Lab Invest* 1969 Jan, 20(1) : 101-18.
- 2) Holt PG, Oliver J, Bilyk N, et al. : Downregulation of antigen-presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells *in vivo* by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 1993 Feb 1, 177(2) : 397-407.
- 3) Selman M, King TE, Pardo A. : Idiopathic pulmonary fibrosis : prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implication for therapy. *Ann Intern Med* 2001 Jan 16, 134(2) : 136-51.
- 4) Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, et al. : Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2005 May, 166(5) : 1321-32.
- 5) Sisson TH, Mendez M, Choi K, et al. : Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 Feb 1, 181(3) : 254-63.
- 6) Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, et al. : Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997 Sep, 17(3) : 272-278.
- 7) Kuwano K, Kunitake R, Maeyama T, et al. : Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by a caspase inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001 Feb, 280(2) : L316-25.
- 8) Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, et al. : TGFβ signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011 Jun, 300(6) : L887-97.
- 9) Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. : IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003, 149 : 1-38.

- 10) Kida H, Yoshida M, Hoshino S, et al. : Protective effect of IL-6 on alveolar epithelial cell death induced by hydrogen peroxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005 Feb, 288(2) : L342-9.
- 11) Xing Z, Gauldie J, Cox G, et al. : IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory response. *J Clin Invest* 1998 Jan 15, 101(2) : 311-320.
- 12) Saito F, Tasaka S, Inoue K, et al. : Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008 May, 38(5) : 566-71.
- 13) Wallach-Dayana SB, Izbicki G, Cohen PY, et al. : Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 Apr, 290(4) : L790-L796.
- 14) Lazo JS, Pham ET. : Pulmonary fate of [3H] bleomycin A2 in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1984 Jan, 228(1) : 13-8.

ヒト *MUC1* トランスジェニックマウスを用いた 間質性肺炎バイオマーカーの検討

窪田 哲也 酒井 瑞 大西 広志 横山 彰仁*

【背景】 KL-6はMUC1 ムチン上に発現する糖蛋白であり，間質性肺炎の診療に極めて有用なバイオマーカーである．しかしKL-6エピトープはヒトや高等霊長類以外で認めないため，これまで動物で実験はできなかった．そこでヒト *MUC1* トランスジェニック (*hMUC1*-Tg) マウスを用いた肺障害モデルでKL-6がバイオマーカーになるかどうか検討した．

【方法】 *hMUC1*-Tgマウスを用いてリポ多糖(LPS)肺障害モデルとブレオマイシン(BLM)肺線維症モデルを作成し，血清，BALF中のKL-6，SP-D値，蛋白発現について検討した．

【結果】 *hMUC1*-TgマウスはKL-6分子を発現しており，血液やBALFを用いて測定可能であった．ナイーブな*hMUC1*-Tgマウスの血清KL-6値は健常成人と同レベルであった．肺組織を用いた免疫染色ではII型肺胞上皮細胞中心に発現がみられた．LPSモデルでは，早期に血清SP-Dの上昇をみるが，血清KL-6は軽度の上昇にとどまった．一方，BLMモデルでは，血清KL-6値は炎症期に増加し，線維化期に低下傾向があるもののベースラインより高値を示した．血清KL-6値とBALF中のアルブミン濃度には正の相関がみられた．肺障害の種類によりKL-6とSP-Dの動態に乖離がみられた．

【結論】 *hMUC1*-TgマウスはKL-6の動態解析において有用なモデルであり，今後さらなる解析が望まれる．

はじめに

MUC1 ムチンのエピトープの1つであるKL-6は、ヒトのII型肺胞上皮細胞や細気管支上皮に発現しており¹, 間質性肺炎の診断や病型鑑別, 治療効果判定, 予後予測に役立つ優れたバイオマーカーである². このためKL-6は保険適用をうけ広く測定されている³. しかし, KL-6の基礎的な機能や肺障害時の血中への増加機序などについては十分にわかっているとはいえない. 肺障害解析マウスモデルとしてリポ多糖(LPS)モデルやブレオマイシン(BLM)モデルが広く用いられているが, KL-6の発現はヒトや高等霊長類に限られているためこれまで動物実験でKL-6の測定ができなかった. そこで我々はHollingsworthらが確立したヒトMUC1トランスジェニック(hMUC1-Tg)マウス⁴に着目した. 本マウスはヒトMUC1をヒトと同様の臓器に同レベルで発現しており, これまでMUC1を標的とする癌免疫療法の研究に用いられてきたがKL-6発現は検討されていない. 我々はこのマウスでのKL-6発現を検討し肺障害モデルにおけるKL-6の動態を解析した.

方 法

Dr. HollingsworthよりhMUC1-Tgマウス(C57BL/6バックグラウンド)を譲り受け, ヘテロで自家繁殖させた. 本マウスはヒトMUC1遺伝子領域の前後を含む10.6 kbのgenomic DNAを導入して作成されている. 本マウスのヒトMUC1はヒトMUC1発現臓器特異的に発現し, かつ過剰発現はみられない. 年齢・性別をあわせたWild type (Wt) C57BL/6を対照とし, 高知大学動物実験管理規則に従い取り扱った. マウス(各群n = 7-13)の安楽死後, 血清, BALF (PBS 0.5 ml x 3回), 肺組織を回収し検体とした. KL-6はルミパルス®KL-6 (エーディア)で測定し, アルブミン, TNF- α , SP-DはそれぞれELISAキット(シバヤギ, Bay Bioscience, ヤマサ)を用いて測定した. マウスを7つのグループ(0, 3, 6, 24, 48, 72, 96時間)にわけ, 腹腔内麻酔後LPS(*E.coli* O111:B4)(シグマ)250 μ g/kgまたは同量のPBSをマイクロスプレー(Penn-Century)を用い気管内単回投与しLPSモデルを作成し各時間に検体を採取した. マウスを腹腔内麻酔後BLM(シグマ)を2 mg/kgまたは同量のPBSを

同様に気管内単回投与しBLMモデルを作成しday 1, 8, 22に安楽死後検体を回収した. 肺組織の一部をH&E染色, マッソントリクロム染色した. Ashcroftスコアにより線維化を評価した. 抗KL-6モノクローナル抗体(エーディアより提供)を用い免疫組織化学を行った. BLMモデルday 22の肺から可溶性コラーゲンを抽出しSircolコラーゲンアッセイキット(Biocol)を用いて測定した. 全肺組織より抽出したtotal RNAよりcDNAを合成し, hMUC1のRT-PCR⁵を行いImage Jにて発現強度を比較しG3PDH発現レベルで補正した. 予備実験により決定した定量的条件(28サイクル)を用いた. また, 全肺組織より標準的方法にてlysateを抽出し, Western blot解析を行い同様に発現強度を比較し β アクチン発現量で補正した. 抗KL-6抗体, 抗ヒトMUC1モノクローナル抗体(Cell Signaling Technology), 抗マウス β アクチンモノクローナル抗体(AbCam), HRP-ヤギ抗マウスIgG1抗体(Jackson Immuno Research)を使用した. データは平均 \pm 標準誤差で表示し, 2群間の解析にはMann-Whitney U検定, 相関性はSpearmanの相関係数を用いた. $p < 0.05$ を有意とした.

結 果

hMUC1-TgマウスのKL-6値は血清で221 \pm 18 U/ml, BALFでは2121 \pm 129 U/ml (n = 13)(Wtは測定限界以下)であった. 免疫組織化学ではhMUC1-TgマウスはII型肺胞上皮細胞や細気管支上皮細胞, 肺胞被覆液(ELF)中にKL-6が陽性であった. 局在は本マウスにおけるhMUC1の分布と一致しヒト肺におけるKL-6発現分布とも一致していた. LPS肺障害モデルでは形態的にもBALF細胞数もWtとhMUC1-Tgマウスで差がなく, 共に既報同様24時間後にピークのある好中球性炎症を認めた. 免疫組織化学(KL-6), 半定量的RT-PCR(hMUC1), Western blot(KL-6, hMUC1)いずれも有意な変化を指摘できなかった. 一方, KL-6値は血清でゆるやかに1.8倍増加し72時間にピークを認め($p = 0.008$), BALFでも同様に徐々に1.6倍増加し72時間にピークを認めた($p < 0.001$). BALF中のTNF- α 値は6時間後にピークを認めたが, アルブミン濃度の有意な変化は指摘できなかった.

BLMモデルでもhMUC1-TgマウスはWtと同様に

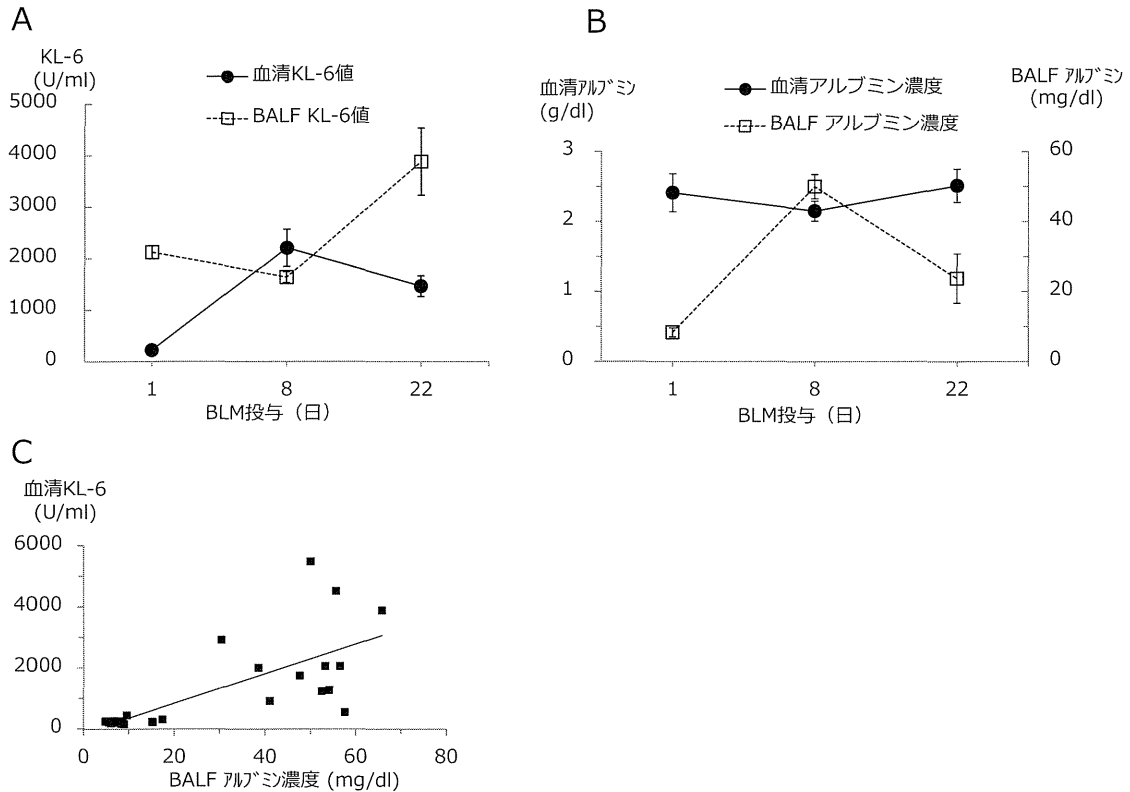


図1. BLMモデル

A. KL-6値, B. アルブミン濃度, C. 散布図

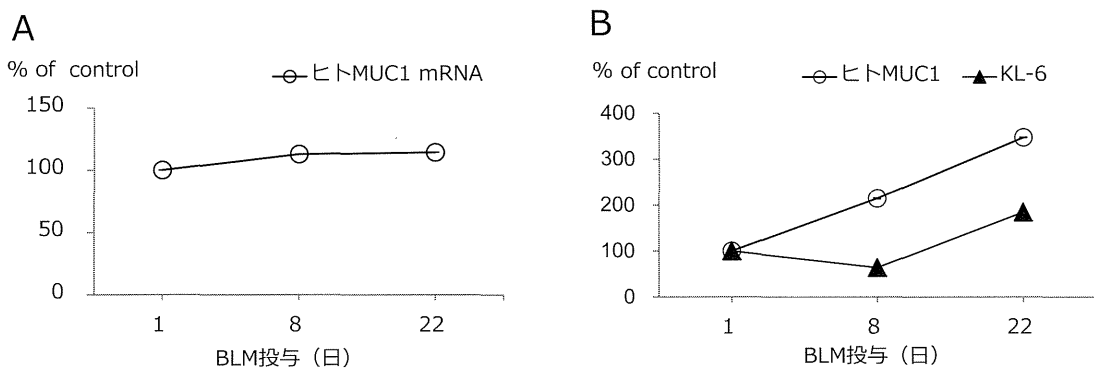


図2. BLMモデルにおけるhMUC1, KL-6の発現強度変化

A. 半定量的RT-PCR(hMUC1), B. Western blot (hMUC1, KL-6)

day 8に炎症性変化, day 22に線維化を示し, 形態的に両群間に差はみられなかった. マッソントリクロム染色, コラーゲン定量, Ashcroftスコアで評価したが, 線維化の程度も両群間に有意な差はみられなかった. 一方KL-6値はBLMモデルではhMUC1-Tgマウスの血清, BALFともに大きく変動した(図1). 炎症期には血清KL-6値は上昇した(約10倍, $p < 0.001$) が, BALFは減少した(0.77倍, $p = 0.009$). 線維化期には血清KL-6は炎症期より減少したもののday 1よりは高値であった($p = 0.006$). 線維化期のBALF中

のKL-6は増加した(day 1の1.8倍, $p = 0.006$). BALF中のアルブミン値はBALF中のKL-6と反対の変化を示し, 血清KL-6値とBALF中のアルブミン値の間には正の相関が見られた($r = 0.767$, $p < 0.001$). 免疫染色ではBALF同様炎症期に部分的にKL-6の発現が低下し線維化期にはday 1より増強していた. 半定量的RT-PCRではhMUC1の発現レベルに有意差をみとめられなかった. Western blot(KL-6, hMUC1)では線維化期のKL-6の増加傾向ならびにhMUC1の有意な増加($p < 0.01$)を認めた(図2).

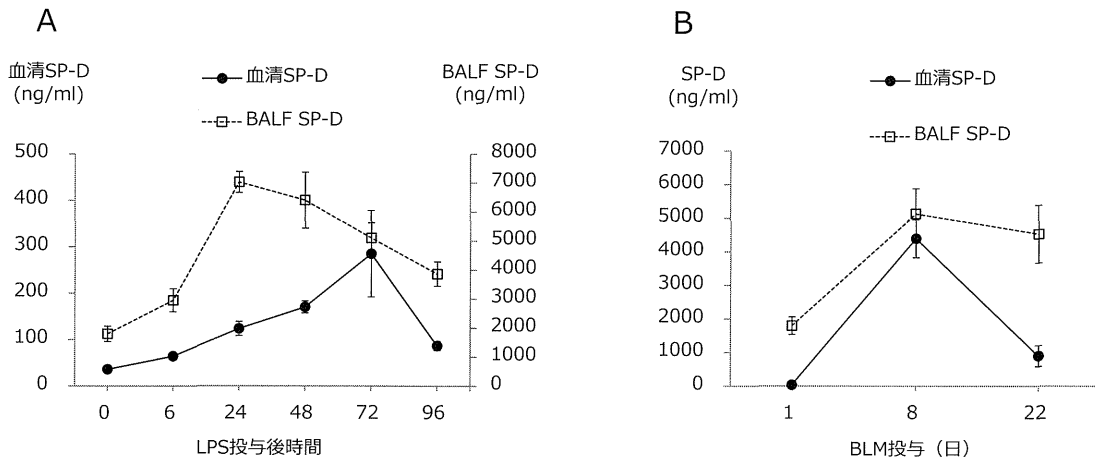


図3. SP-D値
A. LPSモデル, B. BLMモデル

SP-Dに関してはhMUC1-TgマウスとWtの間に明らかな差はなく、LPSモデル、BLMモデルともに血清、BALFで有意に増加した。SP-DはBLMモデルの炎症期BALF中で減少せず線維化期に緩やかに低下した点がKL-6と異なっていた(図3、hMUC1-Tgマウスのみ提示)。

考 察

hMUC1-TgマウスではKL-6がELISAや免疫組織化学で検出可能であり血清KL-6値は健常人と同レベルであった。免疫染色ではKL-6はヒトと同様に主としてII型肺胞上皮細胞から産生されていることが示唆された。本マウスを用いた肺障害モデルでは、LPSモデル、BLMモデルともに従来同様の形態的变化やSP-Dの変動に加えKL-6が肺障害に応じ変動した。LPSモデルでのKL-6の変動は軽度であったが、BLMモデルでは著明に変動した。炎症期のBALF中のKL-6減少、血清での増加はELFから血中への急激な移行を反映していると思われ、免疫組織化学でも同様の所見が得られた。これらより、hMUC1-Tgマウスを用いた肺障害モデルではKL-6がバイオマーカーとして使用できると考えられた。KL-6が血流へ移行する詳細な機序には不明な点があるが、これまで毛細血管透過性の亢進が最も大きな理由であるといわれてきた。BALF中のアルブミン濃度は透過性亢進の指標になる⁶ため、BLMモデルで血清KL-6値とBALFアルブミン濃度に正の相関が見られたことはこの機序を支持している。KL-6変動の

他の可能性として、再生II型肺胞上皮細胞からの産生亢進が考えられる⁷。免疫組織化学ではBLMモデルの線維化期に強いKL-6の発現がみられ産生亢進が示唆された。しかし、線維化期にMUC1蛋白の有意な増加がみられただけで、hMUC1 mRNAやKL-6蛋白の有意な増加は指摘できなかった。これは炎症細胞を含む全肺組織を用いたためハウスキーピング遺伝子で標準化するとシグナルが薄まってしまう可能性が考えられる。その他エピジェネティックな要素⁸やリンパ管を介したクリアランスの関与³も考えられ、今後検討予定である。また、2つの肺障害モデルでのSP-DとKL-6の変動は異なっていた。この差は両者の分子量によるところが大きいと思われる³。巨大分子が透過性亢進によって血流へ多く移行するためにはより重篤なバリアの破壊が必要である。加えて、KL-6は一旦ELFから消失して再び蓄えられるまでにSP-Dよりも時間がかかる可能性もある。今後のさらなる研究が必要である。

結 論

我々はhMUC1-TgマウスがKL-6を産生し肺障害により血清KL-6値が増加することを見出した。本マウスは肺障害やKL-6の機序を研究するのに有用なモデルになると思われた。

参考文献

- 1) Kohno N, Kyoizumi S, Tanabe M, et al: Detection

- of a circulating tumor-associated antigen with a murine monoclonal antibody, LISA 101, selected by reversed indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer Res* 1989, 49: 3412.
- 2) Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Kohno N: Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respir Investig* 2012, 50: 3.
 - 3) Nukiwa T: The role of biomarkers in management of interstitial lung disease: Implications of biomarkers derived from type II pneumocytes. *Eur Respir Mon* 2009, 46: 47.
 - 4) Rowse GJ, Tempero RM, VanLith ML, et al: Tolerance and immunity to MUC1 in a human MUC1 transgenic murine model. *Cancer Res* 1998, 58: 315.
 - 5) Chambers JA, Harris A: Expression of the cystic fibrosis gene and the major pancreatic mucin gene, MUC1, in human ductal epithelial cells. *J Cell Sci* 1993, 105: 417.
 - 6) Hastings RH, Folkesson HG, Matthay MA: Mechanisms of alveolar protein clearance in the intact lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, 286: L679.
 - 7) Kohno N, Awaya Y, Oyama T, et al: KL-6, a mucin-like glycoprotein, in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1993, 148: 637.
 - 8) Cullen PJ: Post-translational regulation of signaling mucins. *Curr Opin Struct Biol* 2011, 21: 590.

肺線維症モデルマウスの病態変化を反映する 新規バイオマーカーとしての circulating miRNA の評価

千葉 茂樹¹ 久田 修¹ 阿部 恭子¹ 小野 学¹
太田 洋充² 大河内真也¹ 一ノ瀬正和¹ 海老名雅仁^{1*}

【目的】間質性肺炎マーカーである血清SP-DとKL-6は必ずしも線維化を直接反映するバイオマーカーではない。我々はマウスブレオマイシン肺障害モデルの病態における、新規モノクローナル抗体を用いたSP-Dと、末梢血(circulating miRNA)および肺組織内microRNAの経時的な変化を比較・検討し、新たな線維化の指標となるcirculating miRNAを模索した。

【研究方法】ブレオマイシンを経気管投与後、0, 3, 7, 14, 21日目の末梢血、肺組織、およびBAL中の各パラメータと、0, 7, 21日目の肺組織miRNAとcirculating miRNAのmicroarrayの結果を比較した。

【結果】血清SP-Dは肺線維化よりも炎症と強く相関し線維化が遷延する21日目にはピーク値の3分の1ほどまで減少した。miRNA microarrayでは、circulating miRNAとして143個のmiRNAが大きく変動していた。肺組織中miRNAとcirculating miRNAの経時変化を比較したところ、miR-322, miR-874, miR-155が線維化期に肺組織と血清中で共に上昇した。

【結論】血清SP-Dは肺の炎症を特異的に非常によく反映したが、線維化に関しては経時変化に乖離が見られたことから血清SP-Dは肺の炎症をより強く反映することが示唆された。また、miR-322とmiR-874, miR-155について線維化マーカーとしての可能性が示唆された。

¹ 東北大学呼吸器内科

² 埼玉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 研究分担者

【研究背景】

間質性肺炎の臨床において血清マーカーが広く利用されている。代表的なものとして、Surfactant protein D (SP-D), Krebs von den lungen-6 antigen (KL-6) が上げられる。臨床的に汎用されている2つのマーカーであるが、KL-6/MUC1 遺伝子はラット・マウスには存在せず、また、ラット・マウス SP-D に対する有用な抗体がなかったため動物モデルでの詳細な検討は行われていない。しかし、現在はラット・マウス SP-D に対する新規モノクローナル抗体が市販され、マウスモデルでの血清 SP-D 値の測定が可能になった¹。マウスブレオマイシンモデルにおける血清 SP-D 値と肺の炎症、線維化との詳細な検討は、これまでにはないため、我々は詳細な検討を行った。

さらに、SP-D と KL-6 は共に肺胞上皮細胞より分泌され、純粋な線維化マーカーではないという問題点がある。そこで、我々は血液中を循環する microRNA (Circulating miRNA) に着目し、新しい血清マーカーの検索を行った。miRNA は、遺伝子発現を抑制する効果を持つ 21 ~ 25 塩基程度の一本鎖 RNA である。ゲノム上にコードされているが蛋白質へは翻訳されないノンコーディング RNA で、分化、細胞増殖、アポトーシスなどに深く関与していることが報告されている^{2,3}。ヒトでは現在、1100 個が同定されている。しかし、その詳細な作用に関しては未知の部分が多い。また、エクソソームにより細胞外に分泌され、離れた細胞や臓器に作用することが知られているが⁴、小胞に包まれているため血中に非常に安定的に存在する。煮沸や pH 変化、10 回の凍結溶解後でも検出可能であったとの報告や⁵、乾燥した血清からも検出可能であったという報告もある⁶。臨床的には、癌、敗血症、急性心筋梗塞の患者の血液から安定して検出され、病態との関連が報告されている⁷⁻¹⁰。肺線維症においても miRNA は基礎的、臨床的研究がなされているが¹¹⁻¹⁴、血清マーカーとしての circulating miRNA に関する研究はまだない。

今回、我々は新規のマウス SP-D 測定系を用いて血清 SP-D の有用性を検討すると共に、新規線維化マーカーとしての circulating miRNA を同定するため研究を行った。

【研究目的】

間質性肺炎マーカーである血清 SP-D の有用性を、新規に確立された抗 SP-D モノクローナル抗体を用いてマウスブレオマイシンモデルにおいて詳細に検証する。また、同マウスモデルにおける血清線維化マーカーとして有用な circulating miRNA を検索する。

【研究方法】

I マウスブレオマイシンモデル

10 週から 12 週齢の雄 C57BL/6J 野生型マウスに 1mg/kg の塩酸ブレオマイシン (日本化薬, BLM) を 50 μ l の生理食塩水に溶解して経気管的に投与した。マウスはブレオマイシン投与後 3, 7, 14, 21 日目に塩酸ケタミンと塩酸キシラジンの腹腔内麻酔を施行し検体を採取した。コントロール群としては無処置マウス (0 日目) を用い、各群 3 匹から 8 匹の範囲で行った。

肺は摘出後、左肺は病理標本に、右肺はコラーゲン含有量の測定と肺湿重量の測定に用いた。Ashcroft score とコラーゲン量を線維化のパラメータ、肺湿重量と BALF 中総タンパク濃度を炎症の指標として用いた。

II ELISA

上記ブレオマイシンモデルにおいて、右心室より採血を行い、血清を SP-D と C-reactive protein (CRP) 測定に用いた。測定には ELISA kit (Murine SP-D, KIT YAMASA EIA ; MOUSE CRP ELISA TEST KIT, Life Diagnostics, West Chester, USA) をそれぞれ使用した。

III 免疫染色

摘出したマウス肺は 10% リン酸緩衝ホルマリンにて注入固定を行った後、パラフィン包埋を行った。マウス SP-D に対する抗体はヤマサ、モノクローナル抗ラット、サーファクタントプロテイン D 抗体 (MAB TO RAT SURFACTANT PROTEIN D) を使用した。

IV microRNA microarray

血清からのRNA回収は、3D-Gene RNA extraction reagent (Toray, Kamakura, Japan)を用いてtotal RNAを精製、抽出した。肺組織からの抽出は10um厚に薄切したFFPE(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded)薄切片から行った。薄切片をキシレン処理後、エタノールにて二回洗浄してキシレンを除去し、その後、組織をプロテアーゼKで37度、一晚処理を行った。遠心処理後、上清からスピニングカラムを用いて、total RNAを精製、抽出した。抽出したtotal RNAはAgilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)で品質を検査した。抽出したtotal RNAはmiRCURY LNA Array miR labeling kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark)を用いてHy5で標識した。標識RNAは3D-Gene Mouse miRNA Oligo chips (v.17.0; 東レ)上でハイブリタイズした。十分に洗浄後、蛍光シグナルを3D-Gene Scanner (東レ)でスキャンし、3D-Gene Extraction software (東レ)にて解析を行った。各スポットの生データは、95%信頼区間のすべての空白スポットの信号強度によって決定されるバックグラウンド信号の平均強度と置換することによって正規化した。バックグラウンド信号強度の2標準偏差(SD)を超える生データ強度を有効とした。各遺伝子の検出された信号は検出された信号強度の中央値が25に調整されるようにグローバルな正規化法により正規化を行った。血清、肺組織のサンプルは3個の個体を混合して使用した。マイクロアレイの結果は2倍以上か2分の1以下の変化を生じたものを有意とした。

V 統計処理

2群間の統計学的比較はt検定を用いて行った。各グループ間の統計学的比較は、コントロール群を基準とし、ダネット(Dunnett)検定で行った。2群間の相関の検定にはピアソンの積率相関係数を用いた。データは平均±標準誤差で表記し、有意水準は0.05以下とした(* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$)。

【結果と考察】

I 血清SP-Dはマウスブレオマイシンモデルにおいて肺損傷による炎症を強く反映する 新規の抗マウスSP-Dモノクローナル抗体を用い

て、マウスブレオマイシン肺障害、線維化モデルにおける血清SP-Dと肺内SP-Dを詳細に検討し、血清SP-Dの有用性について基礎的に検証した。その結果、血清SP-Dは線維化よりも炎症のパラメータとより強く相関がみられた(図1A~E)。また、血清SP-Dは線維化の遷延している21日目には急激に低下し、線維化の経時変化と乖離がみられた(図2A~C)。血清SP-Dは線維化を十分には反映しないことが示唆された。

II 線維化マーカーとしてのcirculating miRNAの可能性

Day7とDay21の両方で優位な変動が見られたcirculating miRNAは11個に上った(図3A~D)。これらのmiRNA(miR-30d, miR-122, miR-690, miR-1907, miR-3096b-5p, miR-501-3p, miR-15a, miR-20b, miR-3095-3p, miR-504, miR-500*)はいずれも線維化との関連は現時点では指摘されていないが、線維化に関連するmiRNAが含まれている可能性があり、今後の研究が必要である。

肺組織での変化から抽出されたmiRNAは46個であった。31個のmiRNAが上昇、15個のmiRNAが低下していた。それぞれの上位10のmiRNAを表1に示す。その中にはmiR-21やmiR-155といった肺線維化を進行させることが示されているmiRNAが実際に上昇していることが確認された^{13,14}。miR-155は肺で3倍以上に上昇し、血清では21日目でのみ僅かに検出された。線維化期での上昇がみられており、miR-155が血清マーカーとなりうる可能性が示唆された。一方、miR-21の発現は肺組織では10倍以上に上昇していたが、血清では大きな変化は無かった。

全体として、miRNAは肺と血清の発現に相関はなく、肺での変化と血清での変化は必ずしも一致しないという結果であった。一方で、miR-322とmiR-874が肺と血清で共通して上昇していた(表3)。Target scan (<http://www.targetscan.org>)によるmiR-322のターゲット予測データにはSMAD2, 3, 5, 7が含まれている。TGF- β シグナル系はSMAD2やSMAD3, SMAD5, SMAD7によって調節を受ける。miR-322のTGF- β シグナル系への関連が考えられmiR-322が線維化に関与しマーカーとなる可能性が示唆された。また、miRNAに関しては、これまで報告された組織別の発現割合がmicroRNA.org (<http://www>.)

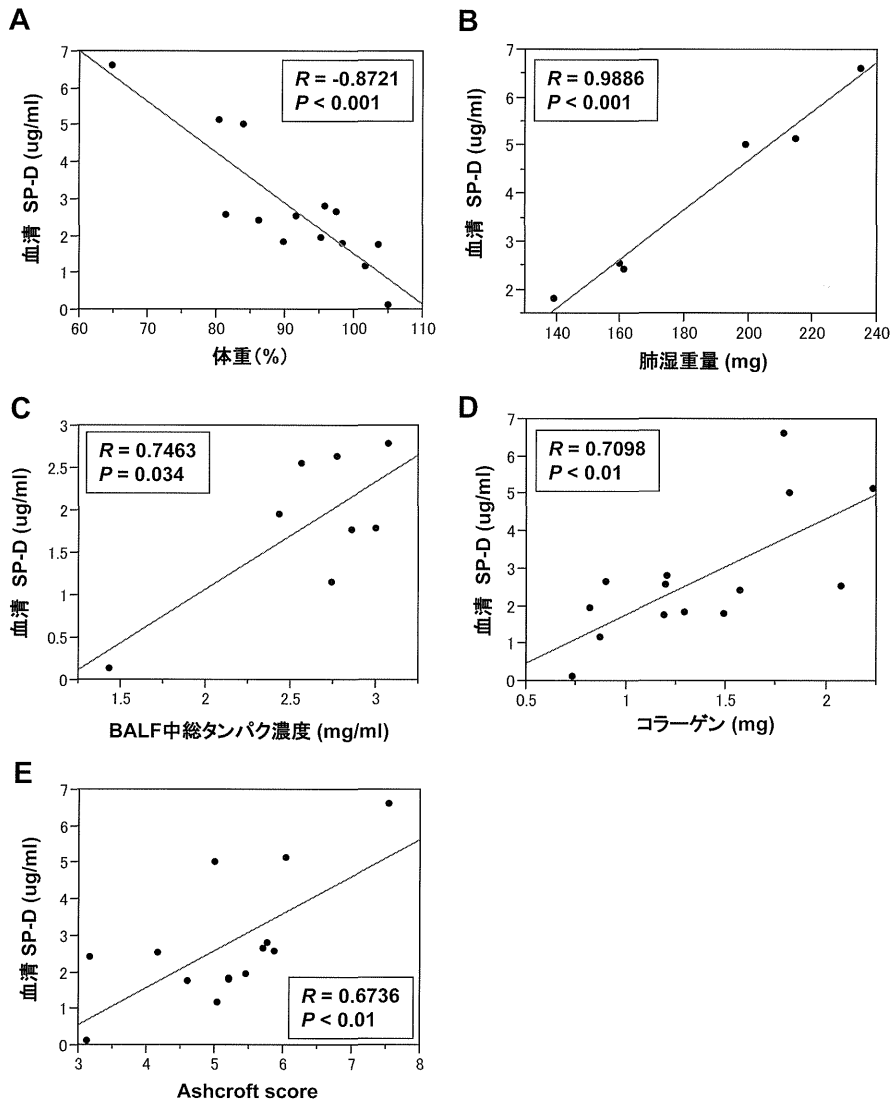


図1 プレオマイシンモデルでの肺線維化と血清SP-Dの経時変化
 サンプルはプレオマイシン投与後、0日、3日、7日、14日、21日後に採取した。(A)肺内コラーゲン量、(B)Ashcroftスコア、(C)血清SP-D。計測値は平均 ± 標準誤差で表し、各群3から8匹のマウスを使用した。計測値はコントロール群であるDay 0を基準に統計処理を行った。(* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$)

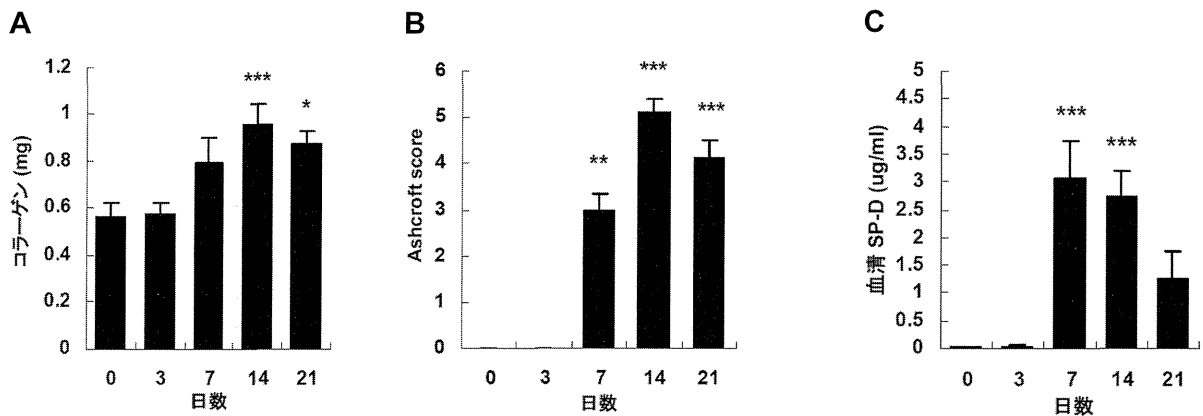


図2 血清SP-Dと炎症、線維化との相関
 ピアソンの積率相関係数による2群間の相関関係。総数はn=14、BALF施行群はn=8、BAL不施行群(肺湿重量測定群)はn=6。
 (A)血清SP-DとBALF中総タンパク濃度 (B)血清SP-Dと肺湿重量 (C)血清SP-Dと肺内コラーゲン量
 (D)血清SP-DとAshcroftスコア (E)血清SP-Dと体重(%)
 (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$)

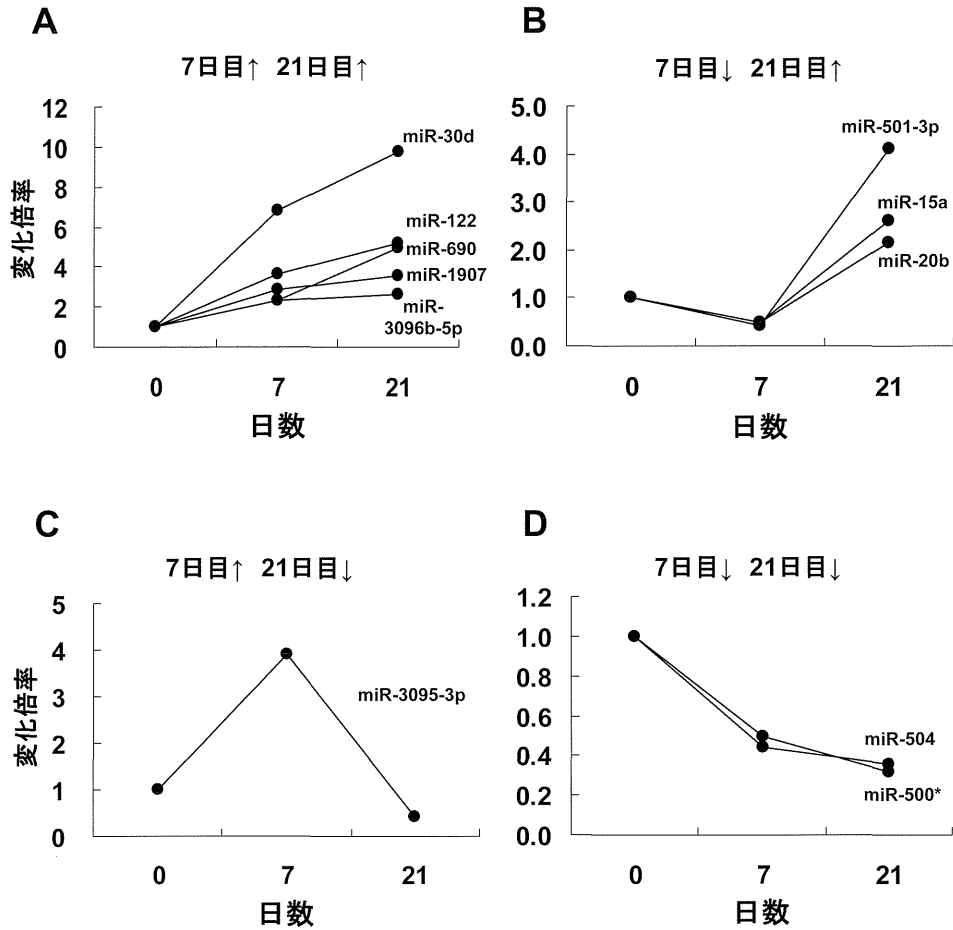


図3 変動を認めた circulating miRNA

プレオマイシン投与後, 7日目と21日目の両方で2倍以上, 2分の1以下の変動があった11個のmiRNAの発現比の変化. (A) 7日目と21日目で上昇したもの. (B) 7日目で減少, 21日目で上昇したもの. (C) 7日目で上昇, 21日目で減少したもの. (D) 7日目で減少, 21日目で減少したもの. miRNA名は右に表記した.

表1 肺組織で増加したmiRNA

Name	ID	Ratio : day21/day0
mmu-miR-21	MIMAT0000530	14.0
mmu-miR-449a	MIMAT0001542	6.0
mmu-miR-126-5p	MIMAT0000137	3.6
mmu-miR-1251	MIMAT0014824	3.3
mmu-miR-218	MIMAT0000663	3.2
mmu-miR-146b	MIMAT0003475	3.2
mmu-miR-155	MIMAT0000165	3.1
mmu-miR-199a-5p	MIMAT0000229	2.8
mmu-miR-34a	MIMAT0000542	2.7
mmu-miR-350	MIMAT0000605	2.6

表2 肺組織で低下したmiRNA

Name	ID	Ratio : day21/day0
mmu-miR-486, mmu-miR-3107	MIMAT0003130, MIMAT0014943	0.27
mmu-miR-1843-3p	MIMAT0014806	0.33
mmu-miR-3971	MIMAT0019356	0.35
mmu-miR-351	MIMAT0000609	0.36
mmu-miR-30c-2*	MIMAT0005438	0.36
mmu-let-7d*	MIMAT0000384	0.39
mmu-miR-150	MIMAT0000160	0.39
mmu-miR-92b	MIMAT0004899	0.42
mmu-miR-1186b	MIMAT0015644	0.42
mmu-miR-92a	MIMAT0000539	0.43

表3 血清と肺組織の両方で増加したmiRNA

Name	ID	Ratio in serum	Ratio in lung tissue
mmu-miR-322	MIMAT0000548	2.3	2.4
mmu-miR-874	MIMAT0004853	2.4	2.2

microrna.org)にて閲覧できる。miR-322の発現プロフィールは胎盤に続いて、線維芽細胞での発現が多くなっている。これは、miR-322が線維芽細胞において何らかの機能的意味を持つことを示唆するものである。

miR-874の機能に関しては癌分野での報告が一つあったのみであった¹⁵。miR-874に関してはデータベース検索を行っても、不明な点が多く今後の研究が必要である。

Ⅲ 臨床応用への展望

近年、miRNA研究は個別のmiRNAの機能解析だけでなく、その多様性を利用した変動パターンによる病態の分類やマーカーとしての解析が行われている。呼吸器分野でも、肺癌の診断において、組織中のmiRNA発現パターンを利用することで従来の方法よりも、感度と特異度を高められることが報告されている¹⁶。肺線維症を含む間質性肺炎は確定診断が病理診断によるが、病理診断については難解で専門医の間でも意見が分かれることがある。診断に関

してcirculating miRNA発現パターンが十分有用な可能性があり、特に間質性肺炎領域にとっては、血清マーカーで診断に寄与できるとすれば患者の身体的負担を軽減することができるため、マーカーとしての報告でも十分な意義があると考えられる。また、今回の研究ではマウスモデルにてcirculating miRNAが間質性肺炎でも十分に変化することとマーカーとしての可能性を示した。更なる研究課題としてはヒト検体での病態や病理診断毎の解析を行っていくことが必要と考えられる。

【結 論】

本研究により、血清SP-Dはマウスブレオマイシンモデルにて肺の炎症を非常によく反映することが示された。これは生きたマウスでの経時変化を観察することも可能であり非常に有用である。また、mir-322とmiR-874、miR-155の血清線維化マーカーとしての可能性が示唆された。miRNAに関しては未だ不明な点が多く、さらに間質性肺炎分野の

circulating miRNAに関する研究は報告されていない。機序は不明ながらも網羅的な検討を行い報告することは当分野の今後の発展に繋がることが期待される。

【文 献】

- 1) Murata M, Otsuka M, Mizuno H, *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of rat pulmonary surfactant protein D using monoclonal antibodies. *Exp Lung Res.* 2010; 36: 463-8.
- 2) Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, *et al.* An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001; 294: 858-62.
- 3) Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer.* 2007; 96 Suppl: R40-4.
- 4) Stoorvogel W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood.* 2012; 119: 646-8.
- 5) Chen X, Ba Y, Ma L, *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008; 18: 997-1006.
- 6) Patnaik SK, Mallick R, Yendamuri S. Detection of microRNAs in dried serum blots. *Anal Biochem.* 2010; 407: 147-9.
- 7) Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 10513-8.
- 8) Wang H, Zhang P, Chen W, *et al.* Evidence for serum miR-15a and miR-16 levels as biomarkers that distinguish sepsis from systemic inflammatory response syndrome in human subjects. *Clin Chem Lab Med.* 2012; 50: 1423-8.
- 9) Wang H, Zhang P, Chen W, *et al.* Serum microRNA signatures identified by Solexa sequencing predict sepsis patients' mortality: a prospective observational study. *PLoS One.* 2012; 7: e38885.
- 10) D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, *et al.* Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2010; 31: 2765-73.
- 11) Pandit KV, Corcoran D, Yousef H, *et al.* Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182: 220-9.
- 12) Cushing L, Kuang PP, Qian J, *et al.* miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; 45: 287-94.
- 13) Liu G, Friggeri A, Yang Y, *et al.* miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med.* 2010; 207: 1589-97.
- 14) Pottier N, Maurin T, Chevalier B, *et al.* Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS One.* 2009; 4: e6718.
- 15) Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, *et al.* Tumour suppressive microRNA-874 regulates novel cancer networks in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2011; 105: 833-41.
- 16) Huang W, Hu J, Yang DW, *et al.* Two MicroRNA Panels to Discriminate Three Subtypes of Lung Carcinoma in Bronchial Brushing Specimens. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 186: 1160-7.

シリカによる慢性進行性肺線維化モデルに対する IL-9阻害の効果

長瀬 洋之¹ 杉本 直也¹ 大田 健^{1,2*}

【背景】特発性肺線維症は緩徐に進行する線維化を特徴とする。シリカによる肺線維症モデルは、緩徐に進行する線維化を示す点で病態解析に有用な可能性がある。以前、同モデルにおけるBALF中液性因子の長期時間経過について検討した。IL-9はシリカ投与3ヶ月以降の線維化期に上昇することを見だし、本研究班で報告したが、IL-9の肺線維化における生体内での役割は不明であった。

【目的】今回は、抗IL-9抗体による阻害実験を行い、IL-9の肺線維化モデルにおける生体内での役割を検討した。

【方法】8週齢のC57/BL6jマウスに、シリカ16mgを単回点鼻投与し、抗IL-9抗体を3, 5, 7週目に腹腔内投与し、8週目に気管支肺胞洗浄及び肺組織採取を行った。Luminex systemを用いて、21種のBALF中液性因子を網羅的に検討した。肺線維化の指標として、ハイドロキシプロリン量を測定した。

【結果】抗IL-9抗体投与で、BALF中細胞成分には有意な変化を認めなかったが、多岐にわたるBALF中液性因子濃度が抑制された。成長因子(G-CSF, GM-CSF)、ケモカイン(KC, MCP1, MIP1 α , eotaxin), Th1サイトカイン(IL-12), Th2サイトカイン(IL-4, IL-13), 炎症性サイトカイン(IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α)の濃度が有意に低下した。抑制性サイトカインであるIL-10濃度には、有意な変化を認めなかった。そして、肺線維化の指標であるハイドロキシプロリン量も有意に抑制された。

【結論】IL-9の阻害により、種々の液性因子濃度が低下し、線維化も抑制された。IL-9は種々の液性因子の産生促進を介して、線維化促進因子として機能することが想定され、肺線維化の治療標的候補たりうることが示唆された。

¹ 帝京大学医学部呼吸器アレルギー内科

² 国立病院機構東京病院

* 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

特発性肺線維症をはじめとする、肺線維化を来す疾患の病態にはいまだに不明な点が多く、その治療戦略も十分には確立していない。特に、特発性肺線維症は、すでに線維化が進行した病期に至っている事が多く、病態の自然史については不明な点が多い。肺線維化のメカニズムを研究する目的で、マウスに対してブレオマイシン投与を行うモデルが広く利用されている。ブレオマイシンによる実験的肺線維化は投与後2週間程度でピークを迎えるとされ¹⁾、その後は自然修復に至ることが報告されている²⁾。一方、ヒトにおける肺線維症は、長期にわたって線維化が緩徐に進行する疾患であり、ブレオマイシンモデルの時間経過とは異なる部分がある。

他の肺線維症モデルとして、シリカ粒子による肺線維化が検討されている。シリカ粒子による線維化は12週にわたって持続する事が報告されており³⁾、長期に進行する線維化を検討するために適したモデルである可能性が考えられた。我々は、慢性進行性の肺線維化モデルを確立する目的で、シリカ点鼻投与による肺病変を24週にわたって観察し、気管支肺胞洗浄液中の液性因子を網羅的に検討した。その結果、IL-9は3ヶ月以降の線維化期に上昇することを見だし、以前本研究班で報告したが⁴⁾、IL-9の肺線維化における生体内での役割は不明であった。

そこで今回は、抗IL-9抗体による阻害実験を行い、IL-9の肺線維化モデルにおける生体内での役割を検討した。

方 法

● 試薬と動物

8週齢雄のC57BL/6マウスを用いた (Japan SLC)。シリカ粒子 (石英標準試料/JAWE459/遊離珪酸分析用、日本作業環境測定協会、東京)は、生理食塩水に懸濁後、ultrasonicateしたものを用いた。

● 実験プロトコル

C57BL/6マウスに対し、16 mgのシリカ粒子を単回点鼻し、抗IL-9抗体 (BioLegend, Clone: D9302C12, 1.0 mg/mL 100 μ l/回)またはcontrol IgG (BioLegend)をシリカ投与3, 5, 7週後に腹腔内投与し、8週目に気管支肺胞洗浄及び肺組織採取を行った。評価項目とし

て、気管支肺胞洗浄液 (BALF)中の細胞数、細胞分画、BALF中サイトカイン・ケモカイン濃度を検討した。BALは、マウスの気管内に28 Gのカニューレを挿入し、生理食塩水0.7 mlを注入、回収することを繰り返し5 mlのBALFを採取し、遠心分離後、上清を-80°Cで保存した。凍結した上清はFreeze dry処置後に、測定時に10倍濃縮となるように、0.5% BSAを含むPBSで溶解した。

BALF中サイトカイン・ケモカイン濃度は、Mouse Cytokine 23-Plex Panel Kit (BIO-RAD, Hercules, USA)を用い、蛍光マイクロビーズアレイシステムであるLuminex[®] (Hitachi, Tokyo) で測定し、G-CSF, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17, eotaxin, monocyte chemotactic protein (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , RANTES, keratinocyte chemoattractant (KC)の23ターゲットの濃度を測定した。各ターゲットに対する特異的二次抗体には、ターゲット毎に異なる蛍光強度で標識された23種類のビーズが結合しており、ビオチン結合特異的二次抗体、ストレプトアビジン-PEでターゲットの濃度を検出した。すなわち、Freeze dry後のBALF上清50 μ lをビーズ結合一次抗体と30分反応させ、洗浄後二次抗体と30分反応、さらに洗浄後、ストレプトアビジン-PEと10分反応させ、Luminex[®]で測定した。

また、線維化の生化学的指標としてヒドロキシプロリン量を測定した。まず肺を凍結乾燥し、乾燥標本の重量を測定後、6 N HCl 2 mlで浮遊し、130 °Cで加熱溶解した。溶解液にメチルレッド (Wako, 大阪)を滴下後、NaOHで中和し、さらに蒸留水を加え、遠心後の上清をサンプルとした。スタンダードとして、L-ヒドロキシプロリン (Wako, 大阪)の希釈系列を作成した。サンプルおよびスタンダードにクロラミンT (Wako, 大阪)、過塩素酸 (Wako, 大阪)、エールリッヒ試薬 (Wako, 大阪)を加え振盪した。60°Cで20分間加熱後、室温に放置して冷却後、561 nmにおける吸光度をプレートリーダー (BIO-RAD, Hercules, USA)を用いて測定した。

BAL細胞から、RNeasy Mini kit (QIAGEN)を用いてmRNAを抽出し、ABI 7500 (Applied Biosystems)を用いて、 $-\Delta\Delta$ CT法でシリカ投与前における発現に対する比を算出した。

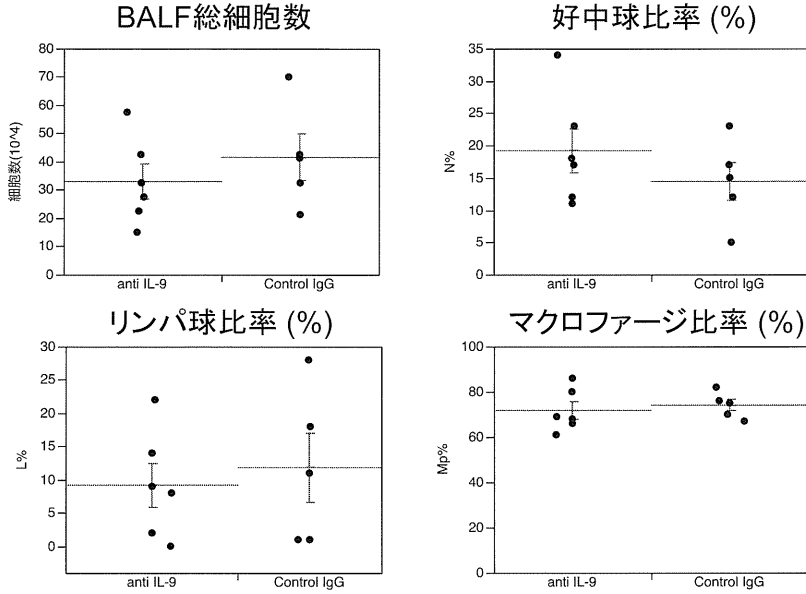


図1. BALF 中細胞分画

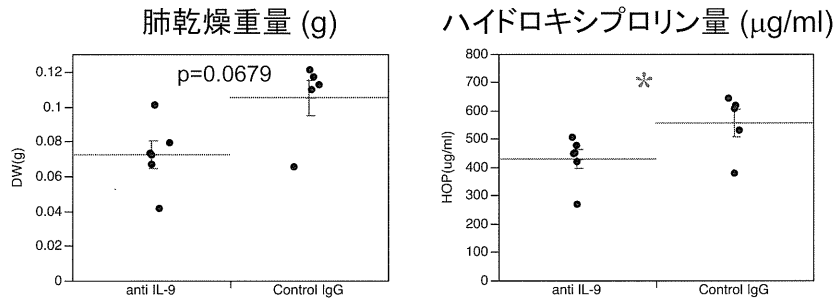


図2. 肺重量とハイドロキシプロリン量

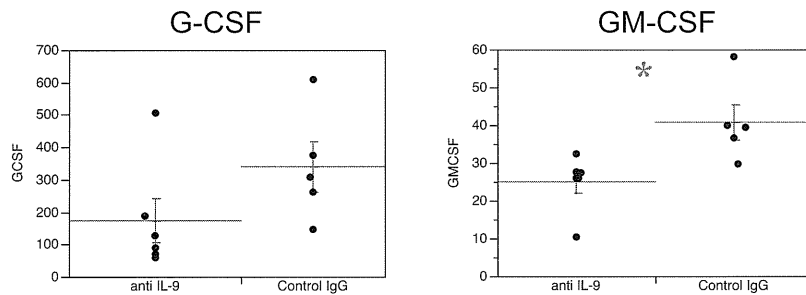


図3. BALF 中成長因子 (pg/ml)

* $p < 0.05$, Control IgG群 vs 抗IL-9抗体投与群

● 統計：Control IgG投与群と、抗IL-9抗体投与群の群間有意差は、Mann-WhitneyのU検定を行って比較した。

結 果

BALF細胞分画に関する結果を図1に示す。BALF総細胞数、各細胞分画比率は、抗IL-9抗体投与によ

る有意な変化を認めなかった。一方、抗IL-9抗体で、肺乾燥重量は減少傾向が認められ、肺線維化の指標であるハイドロキシプロリン量は有意に減少した(図2)。

次に、抗IL-9抗体が、BALF中のサイトカイン、ケモカイン濃度に及ぼす影響を検討した。成長因子に関しては、GM-CSF濃度の有意な減少を認めた(図3)。また、Th1分化に関連するIL-12や、Th2サイト

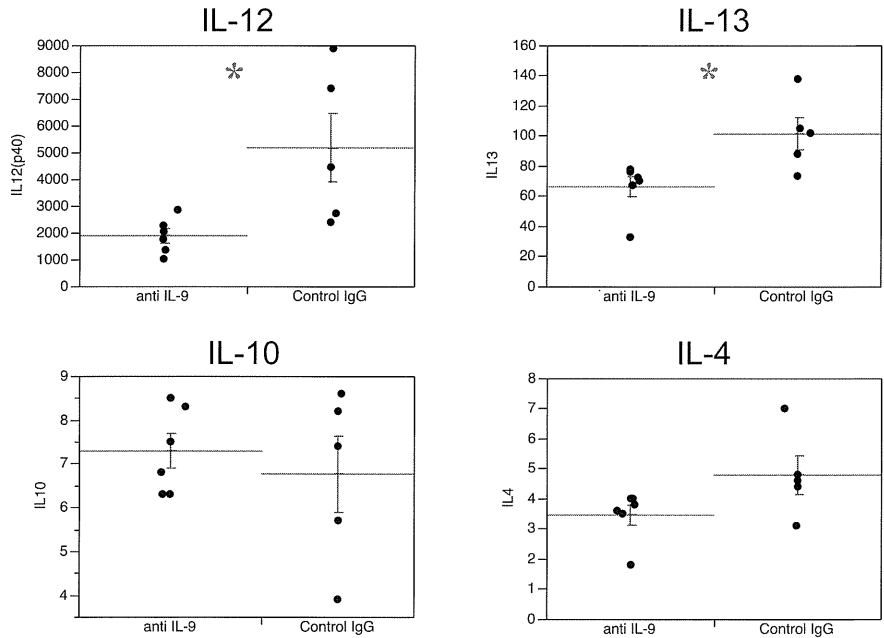


図4. BALF中Thサイトカイン濃度 (pg/ml)
* $p < 0.05$, Control IgG群 vs 抗IL-9抗体投与群

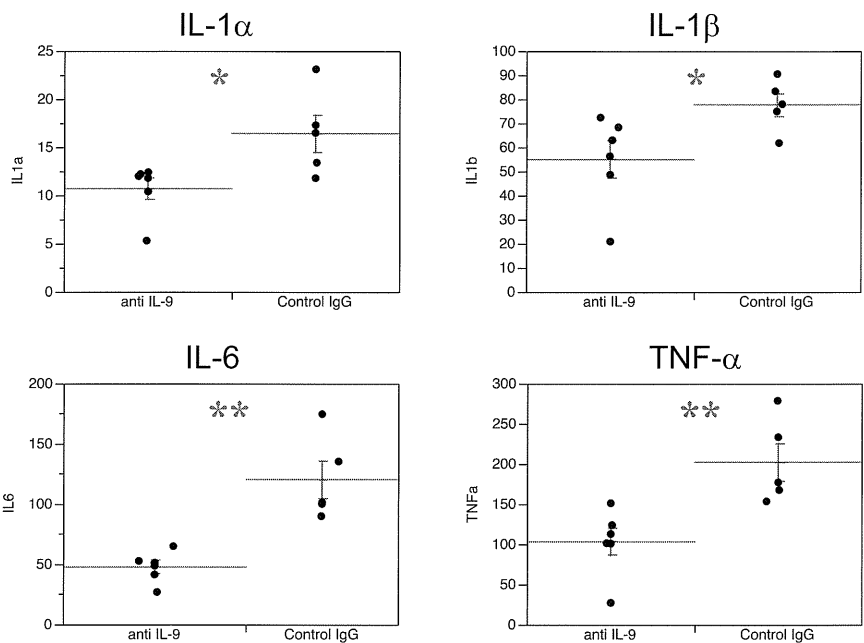


図5. BALF中炎症性サイトカイン濃度 (pg/ml)
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Control IgG群 vs 抗IL-9抗体投与群

カインであるIL-13濃度の有意な低下が認められたが、抑制性サイトカインであるIL-10濃度の有意な変化は認められなかった(図4)。炎症性サイトカインについては広く抑制効果が認められ、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 濃度の有意な減少を認めた(図5)。ケモカインでは好酸球指向性のeotaxin、好中球指向性の

KCの有意な抑制を認め、MCP-1、MIP-1 α 濃度も抑制傾向を示した(図6)。

IL-9の産生細胞として、近日PU.1を転写因子として持つTh9が同定された。図7に、シリカ投与1ヶ月後と3ヶ月後のmRNA発現を示す。PU.1 mRNA発現の増強が、シリカ投与一ヶ月後に認められた。

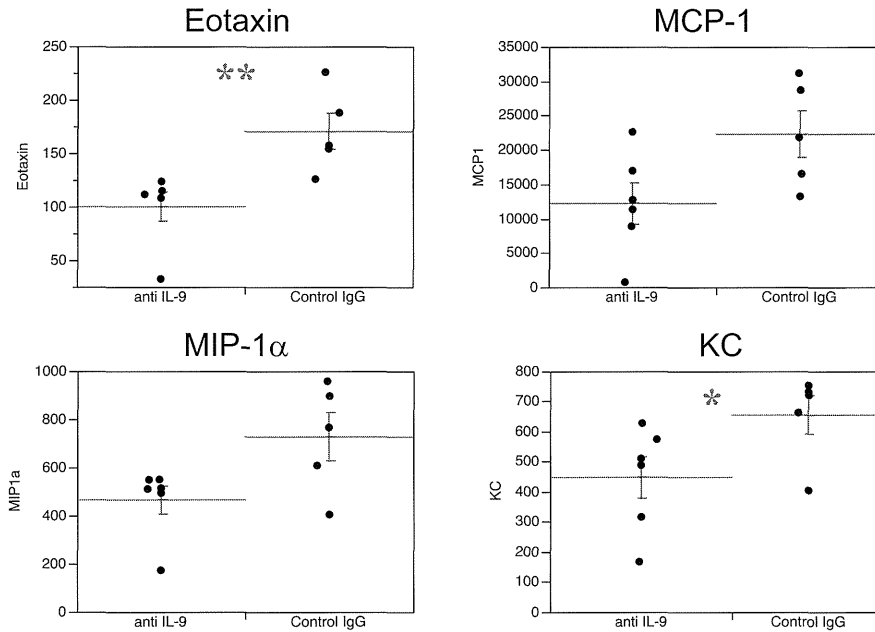


図6. BALF中ケモカイン濃度 (pg/ml)
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Control IgG群 vs 抗IL-9抗体投与群

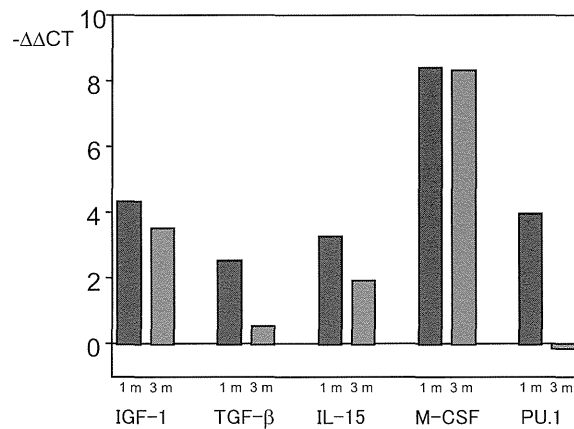


図7. BALF細胞 mRNA 発現
縦軸は、 $-\Delta\Delta CT$ 値を示し、シリカ投与前と比較して、mRNA 発現が $2^{-\Delta\Delta CT}$ 倍となっていることを示す。

考 察

シリカによる慢性進行性肺線維化モデルへの抗IL-9抗体の投与によって、線維化の指標であるヒドロキシプロリン量が有意に抑制され、複数のBALF中成長因子、ケモカイン、Th1/Th2/炎症性サイトカイン濃度が有意に低下した。このことから、今回検討したモデルにおいて、IL-9は線維化促進的に機能している可能性が示唆された。

以前確立した、シリカによる肺線維症モデルの時間経過は、まず1週後をピークとする炎症細胞浸潤

が生じ、それが終息する頃から、4-8週後をピークとするヒドロキシプロリン増加、12週後をピークとする病理学的変化が認められる⁴⁾。殆どのBALF中液性因子濃度は、1-2週後にピークを迎えたが、IL-9のみ遅延して上昇し、24週後にはじめて有意な増加を示した⁴⁾。今回の抗体投与のタイミングとして、ヒドロキシプロリン量の時間経過を参考にして、抗IL-9抗体をシリカ投与後3, 5, 7週目に腹腔内投与し、8週目に検討した。

IL-9の産生細胞は主にTh2細胞であるとされてきたが、近日IL-4産生が少なく、IL-9産生を主体とす

るTh9が同定されている⁵⁾。また、IL-9は標的細胞として、T細胞、B細胞、マスト細胞を活性化する。今回、抗IL-9抗体によって、複数のBALF中液性因子が有意に抑制されたが、その機序として、IL-9によるT細胞やB細胞の活性化が抑制され、直接的に、あるいはマクロファージの活性化抑制を介して、液性因子産生が抑制されたことが推測される。

IL-9のin vivoにおける役割は、気道で強制発現させると、気道過敏性が亢進し、好酸球性炎症を生じ、粘液産生が増加するなど、喘息に類似した病態が惹起されることが報告されている。IL-9が肺線維化に及ぼす影響を検討した報告も2報ある。IL-9はB細胞を活性化することから、B細胞の間質性肺炎に及ぼす役割について検討するために、IL-9を強制発現しB細胞増殖を示すTg5マウスが用いられた⁶⁾。このTg5マウスに対してシリカを投与した場合、コントロールに比してヒドロキシプロリン量や組織学的変化が抑制され、IL-9は抗線維化作用を有することが推定されており、今回の検討とは異なる結果が得られている。さらにこの抑制効果は、IL-9によって活性化されたB細胞がマクロファージを刺激した結果分泌されるプロスタグランジンE2 (PGE2)依存性であることが示唆されている⁷⁾。また、全身性硬化症患者では、血清IL-9値と肺線維化の程度は逆相関するとの報告もある⁸⁾。一方で、アルテルナリアによる喘息モデルでは、IL-9強制発現によってCTGF発現や、基底膜下の線維化が増強することも報告されており⁹⁾、強制発現と抗体投与とのモデルの差異や、検討の時期により異なる結果が生じる可能性が示唆されており、さらなる検討を要する。

また、本モデルにおけるIL-9の産生細胞は明らかでない。PU.1 mRNA発現は一過性に増加したため、Th9からの産生の可能性もあるが、一方で、PU.1はマクロファージにも発現している。今後は、産生細胞をさらに明らかにする必要もあると考えられる。

結 語

シリカ投与による慢性進行性肺線維化モデルにおいて、8週以降の線維化期に局所発現が増強する因子としてIL-9が同定されたが、今回の検討では、IL-9の阻害により、種々の液性因子濃度が低下し、線維化も抑制された。このことから、IL-9は線維化

促進因子であることが想定され、肺線維化の治療標的候補たりうることが示唆されたが、実験モデルによって異なる結果も報告されており、今後さらなる検討が必要である。

文 献

- 1) Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, et al. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 2002; 83:111-9.
- 2) Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294:L152-60.
- 3) Callis AH, Sohnle PG, Mandel GS, et al. Kinetics of inflammatory and fibrotic pulmonary changes in a murine model of silicosis. *J Lab Clin Med* 1985; 105:547-53.
- 4) 長瀬洋之, 大田 健. シリカ肺線維化モデルにおいて遅延して局所発現増加する因子の同定. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服事業 びまん性肺疾患に関する調査研究 平成22年度報告書. 2011:321-7.
- 5) Chang HC, Sehra S, Goswami R, et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol*. 2010;11:527-34.
- 6) Arras M, Huaux F, Vink A, et al. Interleukin-9 reduces lung fibrosis and type 2 immune polarization induced by silica particles in a murine model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:368-75.
- 7) Arras M, Louahed J, Simoen V, et al. B lymphocytes are critical for lung fibrosis control and prostaglandin E2 regulation in IL-9 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:573-80.
- 8) Yanaba K, Yoshizaki A, Asano Y, et al. Serum interleukin 9 levels are increased in patients with systemic sclerosis: association with lower frequency and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol*. 2011;38:2193.
- 9) van den Brûle S, Heymans J, Havaux X, et al. Profibrotic effect of IL-9 overexpression in a model of airway remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37:202-9.