

# Syndecan-4 は肺線維芽細胞において TGF- $\beta$ による collagen と $\alpha$ -SMA mRNA 発現亢進を抑制する

谷野 功典      王    新涛      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      石田 卓      棟方 充\*

Syndecan-4は細胞表面に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンで、そのグリコサミノグリカン側鎖は様々な cytokine, growth factor などと結合し生理学的作用をもつ。特発性肺線維症 (IPF) の肺では上皮細胞やマクロファージに syndecan-4 が強く発現していることから、IPF の病態に関与していることが示唆されるが、肺の線維化における syndecan-4 の役割の詳細は不明な点が多い。そこで、肺線維化における syndecan-4 の役割を検討するために、肺線維芽細胞株 WI-38 を使用し、TGF- $\beta$  刺激後の type I collagen (COL1A1),  $\alpha$ -SMA mRNA 発現亢進と Smad3 と Akt のリン酸化に対する効果に対する recombinant syndecan-4 の co-incubation と syndecan-4 knockdown の効果を検討した。また、TGF- $\beta$  と recombinant syndecan-4 の結合を *in vitro* binding assay で解析し、更に syndecan-4 欠損マウスに bleomycin を気管内投与し、14 日後の COL1A1 と  $\alpha$ -SMA mRNA 発現を wild-type マウスと比較した。肺線維芽細胞 WI-38 において TGF- $\beta$  刺激による COL1A1,  $\alpha$ -SMA mRNA の発現亢進と Smad3, Akt のリン酸化亢進は、recombinant syndecan-4 と TGF- $\beta$  の co-incubation により抑制され、siRNA による syndecan-4 の knockdown により増強された。また、recombinant syndecan-4 は TGF- $\beta$  に濃度依存性に結合した。更に、bleomycin 投与 14 日後の COL1A1 と  $\alpha$ -SMA mRNA 発現は wild-type マウスと比較して syndecan-4 欠損マウスでより増強していた。以上の結果より、syndecan-4 は肺線維芽細胞において TGF- $\beta$  による Smad3 と Akt リン酸化抑制を介し collagen の産生亢進と筋線維芽細胞への分化を抑制することから、IPF における肺線維化の病態への関与が示唆される。

## はじめに

Syndecan-4は、細胞表面に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)であり、ヒトではsyndecan-1から4までの4種類が存在する<sup>1)</sup>。Syndecanはmatrix metalloproteinase (MMP)-7, 9やADAM17などにより細胞表面から切断され、細胞表面型のみではなく可溶性(soluble form)としても存在し<sup>2,4)</sup>、そのヘパラン硫酸側鎖は種々のcytokine, chemokine, growth factorと結合することによって、その生物学的な活性を調節していると考えられている<sup>5)</sup>。

最近、我々はLPS気管内投与マウス肺傷害モデルにおけるHSPG mRNAの発現を検討したところ、syndecan-4のみ上昇がみられたが、他のHSPGは変化していなかった。また、syndecan-4欠損マウスにLPSを気管内投与しwild-typeと比較検討したところ、LPS気管内投与3, 6時間後のBAL液中好中球はsyndecan-4欠損マウスにおいてwild-typeと比較して多く、BAL液中のCXC chemokineであるKC, MIP2もsyndecan-4欠損マウスで高値であった<sup>6)</sup>。これらの結果は、syndecan-4はLPS肺障害において抗炎症作用をもつことを示唆している。

特発性肺線維症(IPF)は、5年生存率が約50%の予後不良の難治性肺線維化疾患であり、肺の傷害に引き続く過剰な修復による線維芽細胞からコラーゲンなど細胞外マトリックスの過剰産生がその病態の本態である<sup>7)</sup>が、その詳細については不明な点が多い。これまで我々は、syndecan-4がIPF肺組織において上皮細胞やマクロファージに強く発現し<sup>8)</sup>、IPF患者からの気管支肺胞洗浄(BAL)液中のsyndecan-4濃度は健常者より高値であることを示している<sup>9)</sup>が、

今回の検討では、肺線維芽細胞株を使用して肺の線維化におけるsyndecan-4の役割を検討した。

## 方 法

肺線維芽細胞株WI-38を使用し、TGF- $\beta$  (1 ng/ml) 刺激24時間後のtype I collagen (COL1A1) と $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) のmRNA発現(定量的RT-PCR)と、刺激15分後のSmad3とAktのリン酸化(Western blotting)に対するsyndecan-4の役割を知るために、まずrecombinant syndecan-4 (1000 ng/ml) とTGF- $\beta$ のco-incubationの有無、次にsyndecan-4 siRNA 導入によるsyndecan-4 knockdownの有無の効果を検討した。更に、TGF- $\beta$ とsyndecan-4との結合を検討するために、recombinant TGF- $\beta$  (5 ng/ml) をELISA plateにcoatingし、種々の濃度のrecombinant syndecan-4と4°C overnightでincubate後、480 nmによる吸光度(OD480)を測定した。最後に、syndecan-4の肺線維化における役割を*in vivo*で検討するために、syndecan-4欠損マウスにbleomycin (2.5 mg/kg) を気管内投与し、投与14日後の肺組織におけるCOL1A1と $\alpha$ -SMA mRNAの発現をwild-typeマウスと比較した。

## 結 果

肺線維芽細胞株WI-38において、TGF- $\beta$ 刺激24時間後にCOL1A1と $\alpha$ -SMA mRNAの増加が認められ、刺激15分後にSmad3のリン酸化亢進が認められた(data not shown)が、TGF- $\beta$ とrecombinant syndecan-4のco-incubationは24時間後のCOL1A1と $\alpha$ -SMA mRNAの増加を抑制し(Figure 1)、15分後のSmad3

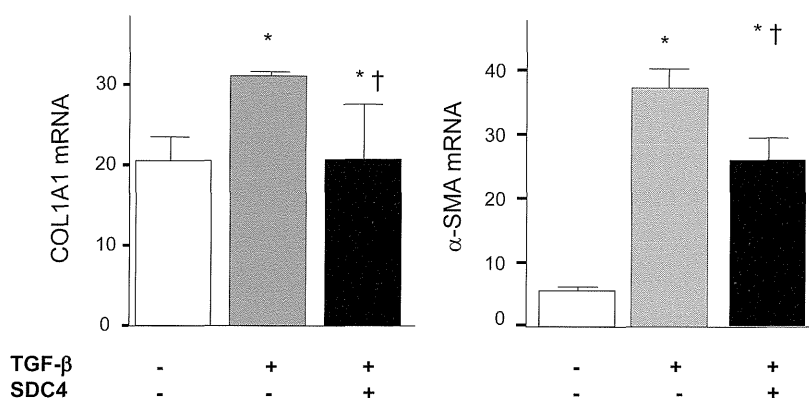


Figure 1. Effect of Syndecan-4 on COL1A1 and  $\alpha$ -SMA mRNA Expression after TGF- $\beta$  Stimulation. SDC4: syndecan-4. \*:  $p < 0.01$  vs. Medium only, †:  $p < 0.05$  vs. TGF- $\beta$ . Means + SE.

と Akt のリン酸化亢進を抑制した (Figure 2). 更に, syndecan-4 siRNA の導入細胞において, 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), また 15 分後の Smad3 と Akt のリン酸化は 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, TGF-β は syndecan-4 と濃度依存性に結合することが *in vitro* binding assay で示され (Figure

4), 更に, syndecan-4 欠損マウスでの bleomycin 気管内投与 14 日後の肺組織における COL1A1 と α-SMA mRNA 発現は, wild-type マウスと比較して高値であった (Figure 5).

### 結論と考察

今回, 我々は肺線維化における syndecan-4 の役割を明らかにするために, 肺線維芽細胞株 WI-38 への TGF-β 刺激に対する syndecan-4 の作用を検討した. Syndecan-4 は, 生体内では細胞表面に存在するとともに, shedding を受け可溶型としても存在する<sup>1-3)</sup>. 今回の検討で, recombinant syndecan-4 が TGF-β による collagen と α-SMA 発現の増加を抑制し, syndecan-4 siRNA により syndecan-4 の発現を抑制すると TGF-β による collagen と α-SMA 発現の増加が更に亢進し, また TGF-β と syndecan-4 が結合すること

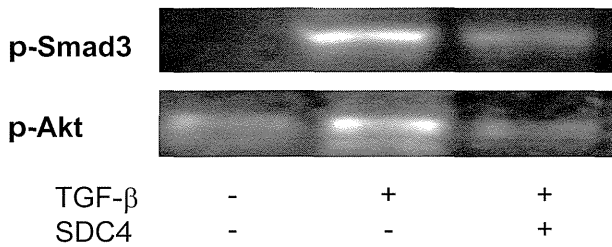


Figure 2. Effect of Syndecan-4 on Phosphorylation of Smad3 and Akt Expression. SDC4: syndecan-4.

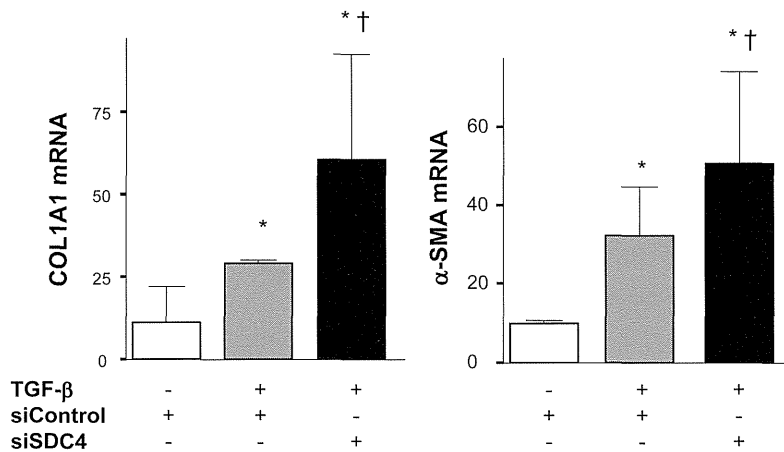


Figure 3. Effect of Syndecan-4 siRNA on COL1A1 and α-SMA mRNA Expression after TGF-β Stimulation. SDC4: syndecan-4. \*: p < 0.01 vs. Medium only, † : p < 0.05 vs. TGF-β. Means ± SE.

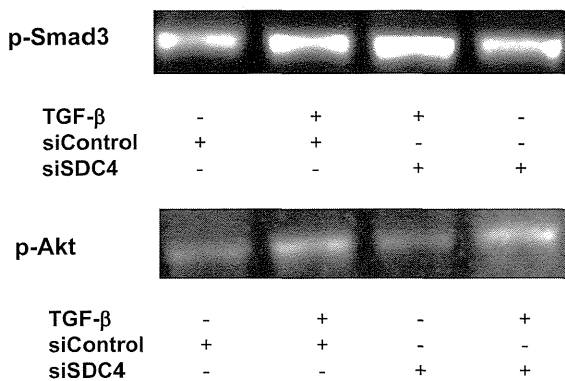


Figure 4. Effect of Syndecan-4 siRNA on Phosphorylation of Smad3 and Akt Expression. SDC4: syndecan-4.

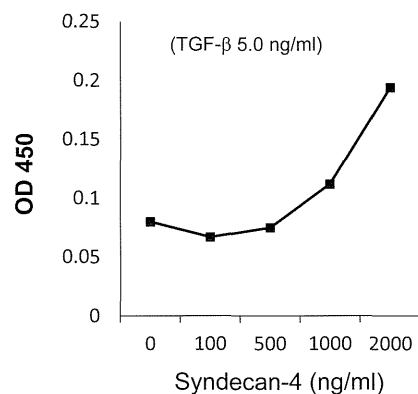
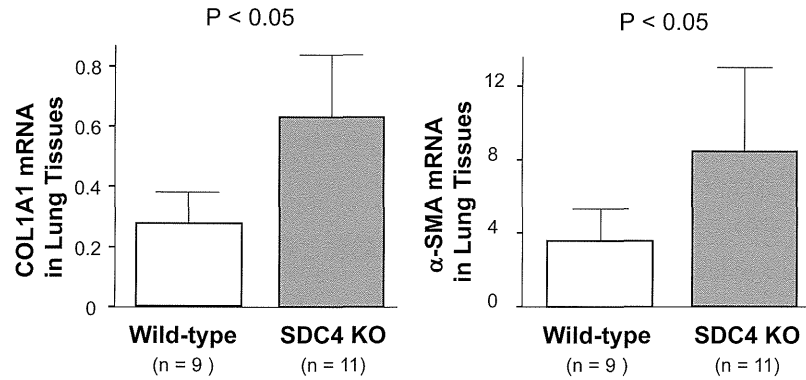


Figure 5. Binding of TGF-β to Syndecan-4.



**Figure 6.** mRNA Expression of COL1A1 and α-SMA in Syndecan-4 Deficient Mice (SDC4 KO) after BLM Instillation. Day 14 after BLM instillation. Means + SE.

を証明できたことから、可溶性と細胞表面の syndecan-4 は TGF-β と結合し、TGF-β と TGF-β receptor との結合を抑制することによって Smad3 と Akt のリン酸化亢進の抑制を介して肺線維化を抑制すると考えられた。

近年、Jiang らは syndecan-4 欠損マウスを使用し bleomycin 気管内投与後の肺の線維化を wild-type マウスと比較検討し、syndecan-4 は抗線維化作用を持つ chemokine である CXCL10 とヘパラン硫酸側鎖を介して結合し、CXCL10 による線維芽細胞の遊走を抑制することにより肺の線維化を抑制すると報告している<sup>10)</sup>。また、Echtermeyer らは syndecan-4 欠損マウスでは血管新生や皮膚の組織修復作用が損なわれていることも報告しており<sup>11)</sup>、syndecan-4 は組織の傷害・修復に重要な役割を果たしていると考えられる。

我々の気道上皮細胞株 BEAS-2B を使用した *in vitro* の検討では、recombinant syndecan-4 の前処置は LPS や TNF-α による CXCL8 mRNA の増加を抑制しており、syndecan-4 のヘパラン硫酸側鎖を介した TNF-α と recombinant syndecan-4 の結合が TNF-α と BEAS-2B 上の TNF-α receptor との結合を抑制することにより CXCL8 mRNA 増加を抑制したと考えられる<sup>9)</sup>。Jiang らのマウス bleomycin 肺線維症モデルの検討<sup>10)</sup>では、BAL 液中の TGF-β 濃度は syndecan-4 欠損マウスと wild-type マウスでは差が認められなかったにも関わらず、syndecan-4 欠損マウスでは肺の線維化が高度であったことから、syndecan-4 は TGF-β の発現抑制を介さずに TGF-β による細胞内シグナルの活性化抑制を引き起こしていると考えられる。以上より、syndecan-4 は側鎖であるヘパラン硫

酸と種々のメディエーターとの結合を介して、抗炎症作用や抗線維化作用を持つと考えられるが、細胞表面の syndecan-4 はコア蛋白を介して PKCα の活性化などの細胞内のシグナル伝達に直接関与しているとも報告されており<sup>12,13)</sup>、いまだ不明な点も多い。

今回の検討により、syndecan-4 が肺線維化抑制作用をもつことが明らかになった。今後、IPF など難治性肺線維化疾患に対する syndecan-4 などのプロテオグリカン、グリコサミノグリカンを target とした治療法の開発に向けて、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

#### 参考文献

- 1) Gotte M. Syndecans in inflammation. *FASEB J* 17: 575-591, 2003.
- 2) Rapraeger AC. Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol* 149: 995-998, 2000.
- 3) Fitzgerald ML *et al*: Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* 48: 811-824, 2000.
- 4) Pruessmeyer J *et al*: A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells. *J Biol Chem* 285: 555-564, 2010.
- 5) Manon-Jensen Tet *al*: Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J* 277: 3876-3889, 2010.
- 6) Tanino Y *et al*: Syndecan-4 regulates early

- neutrophil migration and pulmonary inflammation in response to lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47: 196-202, 2012.
- 7) Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis: increased survival with “gastroesophageal reflux therapy” : fact or fallacy? *Am J Respir Crit Care Med* 184:1330-1332, 2011.
- 8) 谷野功典 他, 間質性肺炎における syndecan-4 の役割 厚生労働科学研究 特発性肺線維症の予後改善を目指したサイクロスポリン+ステロイド療法ならびにNアセチルシステイン吸入療法に関する臨床研究 平成19年度研究報告書 125-128, 2008
- 9) 谷野功典 他, サルコイドーシスにおける syndecan-4 の役割 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 びまん性肺疾患に関する調査研究班 平成21年度研究報告書 273-277, 2010
- 10) Jiang D *et al*: Inhibition of pulmonary fibrosis in mice by CXCL10 requires glycosaminoglycan binding and syndecan-4. *J Clin Invest* 120:2049-2057, 2010.
- 11) Echtermeyer F *et al*: Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest* 107:R9-R14, 2001.
- 12) Shin J *et al*: Solution structure of the dimeric cytoplasmic domain of syndecan-4. *Biochemistry* 40:8471-8478, 2001.
- 13) Lim ST *et al*: Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C alpha (PKC alpha) increases focal adhesion localization of PKC alpha. *J Biol Chem* 278:13795-13802, 2003.

# TGFβ誘導上皮間葉移行におけるβcatenin細胞質内移行に 対するPTENリン酸化部位制御の重要性

橋本 直純<sup>1</sup> 今泉 和良<sup>2</sup> 長谷川好規<sup>1\*</sup>

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、骨髄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。これら多様な線維芽細胞が形成する線維化病変は、TGFβ過剰産生および低酸素状態など組織微小環境を形成している。我々は、組織微小環境がもたらすさまざまなEMT誘導刺激を包括的に制御し得るPTENの生理活性が、EMT誘導刺激によるPTEN C末端部位のリン酸化によって減弱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を制御することを明らかにした。しかしながらどのような機序によりEMTを制御するかという点については明らかではなかった。こうした中TGFβ誘導EMT関連転写遺伝子発現は細胞膜上に存在するβ-cateninの細胞質内移行によって誘導されることが報告された。我々は、PTENのC末端側リン酸化部位修飾によりTGFβ刺激によるβ-cateninの細胞膜から細胞質内への局在移行を完全に制御することによりEMTを抑制することを明らかにした。このように、PTENのC末端側リン酸化部位制御による機序を詳細に解析することは、EMTなどの表現型誘導機序を明確にすることにつながると考えられた。

## A critical role of phosphorylation of the PTEN C-terminus in TGFβ-induced β-catenin translocation into cytoplasm during EMT

Naozumi Hashimoto<sup>1</sup>, Kazuyoshi Imaizumi<sup>2</sup>, Yoshinori Hasegawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine

<sup>2</sup>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. 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. We showed that TGFβ and hypoxia in tissue microenvironment modulate phosphorylation levels of the PTEN C-terminal tail, resulting in loss of PTEN activity. We also demonstrated that modulation of phosphorylation sites in the PTEN C-terminal tail could rescue TGFβ and hypoxia-induced EMT. Nevertheless, the biological mechanisms remain elusive. Recently, TGFβ-induced translocation of β-catenin from E-cadherin complexes into cytoplasm is involved in the transcription of EMT target genes. In the present study, our data suggest that mutation of phosphorylation sites in the PTEN C-terminal tail (PTEN4A) inhibited EMT through complete blockade of β-catenin translocation into cytoplasm, besides the inhibitory effect of PTEN4A on TGFβ-induced activation of smad-independent signaling pathways. Thus, this exploration leads to illuminate the mechanisms, by which lung fibrosis develops.

## 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(2,3)。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(4)。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、TGF $\beta$ 過剰産生および低酸素状態をもたらしている(5)。我々は組織微小環境因子であるTGF $\beta$ や低酸素刺激はPTEN発現低下およびPTEN C末端リン酸化部位リン酸化亢進を誘導することによりPTEN活性低下をもたらすことを明らかにした(6)。また、PTENC末端のリン酸化部位の修飾はこれら微小環境因子誘導EMTを制御することも合わせて明らかにした(6)。しかしながら、その分子学的機序は明らかではなかった。今回これらを明らかにすることを目的とした。

## 方 法

### 1) TGF $\beta$ 刺激による $\beta$ -catenin細胞質内移行の検証

肺胞上皮細胞を用いてTGF $\beta$ 刺激による $\beta$ -catenin細胞質内移行を免疫染色で評価した。

### 2) PTEN C末端リン酸化部位遺伝子変異によるTGF $\beta$ 誘導 $\beta$ -catenin細胞質内移行制御効果の検討

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 $\beta$ 刺激による $\beta$ -catenin細胞質内移行を免疫染色で評価し

た。さらにすでに間葉系表現型を有するH1299細胞にPTENwild, PTEN4A, コントロールベクターを安定発現した細胞株を樹立してTGF $\beta$ 刺激による $\beta$ -catenin細胞質内移行に対する抑制効果を評価した。

## 結 果

1) 肺上皮細胞において $\beta$ -cateninは細胞膜に局在することを免疫染色で確認した。TGF $\beta$ 刺激により $\beta$ -cateninは細胞膜から細胞質へ移行することを観察した。

2) TGF $\beta$ 刺激下Dox非投与H358肺上皮細胞ではEMTを介したE-Cadherinの減弱とFibronectinの増強を認めていたが、これに一致して $\beta$ -cateninは細胞膜から細胞質内に移行した。一方、TGF $\beta$ 刺激下Dox投与肺上皮細胞ではGFPおよびGFP-PTENwild導入細胞株では $\beta$ -cateninは細胞膜から細胞質へ移行した。一方、GFP-PTEN4A導入細胞株ではTGF $\beta$ 投与によっても $\beta$ -cateninは細胞膜に局在したままであった。すでに間葉系表現型を有するH1299細胞では、コントロールベクター導入株では、TGF $\beta$ 非刺激下においても $\beta$ -cateninは細胞質内移行を示した。一方、PTENwild, PTEN4A導入株では、TGF $\beta$ 非刺激下において $\beta$ -cateninは細胞膜に局在した。TGF $\beta$ 刺激下では、PTENwild導入H1299細胞株では $\beta$ -cateninは細胞質内移行を示したのに対して、PTEN4A導入H1299細胞株では細胞膜に局在したままであった。

## 考案・結論

我々は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)、これらの多様な線維芽細胞が形成する線維化病変は、TGF $\beta$ 過剰産生および低酸素状態などの組織微小環境をもたらして、さらなる線維化病変形成を誘導するという仮説を立ててその検証を行っている。線維化病変はさまざまなEMT誘導刺激因子を供給する微小環境であることを示唆するので、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認識に至った(5)。

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、我々はTGF $\beta$

<sup>1</sup> 名古屋大学医学部呼吸器内科

<sup>2</sup> 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

過剰産生および低酸素状態などの組織微小環境因子がPTENC末端リン酸化部位をリン酸化修飾するとともにPTEN活性減弱をもたらした。その結果としてEMT誘導をもたらすことを明らかにした。しかしながら、その機序は明らかにされていなかった。β-cateninはE-cadherin複合体の一部の構成分子であり細胞膜に局在することが知られていて、TGFβ刺激によるfibronectinやvimentinなどのEMT標的分子誘導時にはβ-cateninが細胞膜から細胞質内へ移行することが知られている(7)。しかしながら、組織微小環境因子であるTGFβ刺激によるβ-catenin細胞内移行はPTENC末端リン酸化を介するかどうかは明らかでなかった。

我々は肺上皮細胞がTGFβ刺激により有意なPTEN発現抑制とPTENC末端リン酸化亢進をもたらされることを明らかにしたが(6)、今回我々はTGFβ刺激によりβ-cateninが細胞膜から細胞質内へ移行することを確認した。そこで、PTENC末端リン酸化部位のリン酸化阻害がTGFβ刺激によるβ-cateninの細胞膜から細胞質内への移行を制御するかどうかを検討した。PTENC末端リン酸化部位遺伝子変異PTEN4A導入はTGFβ刺激によるβ-cateninの細胞質内移行を阻止したが、PTENwild遺伝子導入はTGFβ刺激によるβ-cateninの細胞質内移行を阻止できなかった。さらに、すでに間葉系表現型を有するH1299細胞株でも検証したが、コントロールベクター導入H1299細胞はTGFβ非刺激下においてもβ-cateninはすでに細胞質内に移行して分布していた。しかしながらPTENwildおよびPTEN4A導入によって、β-cateninは細胞膜に局限することをもたらした。TGFβ刺激下においてPTENwild導入細胞株ではβ-cateninは細胞質内移行を示すにも関わらず、PTEN4A導入細胞株ではTGFβ刺激下においてもβ-cateninは細胞膜に局限することを確認した。このことは、TGFβなど組織微小環境因子が存在しない場合、PTENC末端リン酸化部位はリン酸化を受けずにPTENの活性は保たれてβ-cateninを細胞膜に保持することをもたらすが、TGFβなど組織微小環境因子刺激によりPTENC末端リン酸化部位のリン酸化が亢進してPTENの活性減弱が誘導されることによってβ-cateninが細胞質内移行するとともにEMT獲得に至ることを示唆している。一方、PTENC末端リン酸化部位遺伝子変異PTEN4AはPTENC末端

リン酸化部位のリン酸化を完全に抑制することをもたらして、TGFβなど組織微小環境因子刺激によってもβ-cateninの細胞質内移行を制御してEMT表現型獲得を完全に抑制したと考えられた。

この知見は、TGFβ刺激のない正常状態においてもPTEN4A導入はβ-cateninの細胞内局在を細胞膜上に局在を誘導する一方、TGFβ刺激が存在する病的状態においてもPTEN4A導入はβ-cateninを細胞膜上に維持するとともにEMT表現型獲得を完全に抑制することが予測される。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おいて過剰刺激を適正に制御することを示唆する可能性をさらに支持するものである。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、我々はウイルスを用いたPTEN4A遺伝子導入による効果を検証中である。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得られるように継続して検証をおこなう。

## 引用文献

- 1) Hashimoto, N., H. Jin, T. Liu, S. W. Chensue, and S. H. Phan. 2004. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 113(2):243-52.
- 2) Kim, K. K., M. C. Kugler, P. J. Wolters, L. Robillard, M. G. Galvez, A. N. Brumwell, D. Sheppard, and H. A. Chapman. 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(35):13180-5.
- 3) Willis, B. C., J. M. Liebler, K. Luby-Phelps, A. G. Nicholson, E. D. Crandall, R. M. du Bois, and Z. Borok. 2005. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166(5):1321-32.
- 4) Hashimoto, N., S. H. Phan, K. Imaizumi, M.



Matsuo, H. Nakashima, T. Kawabe, K. Shimokata, and Y. Hasegawa. 2010. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43(2):161-72.

5) Sakamoto, K., N. Hashimoto, Y. Kondoh, K. Imaizumi, D. Aoyama, T. Kohnoh, M. Kusunose, M. Kimura, T. Kawabe, H. Taniguchi, and Y. Hasegawa. 2012. Differential modulation of surfactant protein D under acute and persistent hypoxia in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303(1):L43-53.

6) 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 びまん性肺疾患に関する調査研究班 平成23年度研究報告書 上皮間葉移行を含むTGF $\beta$ 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 p305

7) Medici, D., E. D. Hay, and B. R. Olsen. 2008. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol Biol Cell* 19(11):4875-87.

# 特発性肺線維症 (IPF) におけるオートファジーの果たす役割 (オートファジーによる筋線維芽細胞分化の制御)

原 弘道      荒屋 潤      小林 賢司      伊藤 三郎      高坂 直樹  
和久井 大      吉井 悠      鶴重千加子      小島 淳      清水健一郎  
石川 威夫      沼田 尊功      河石 真      斉藤 桂介      金子 由美  
中山 勝敏      桑野 和善\*

特発性肺線維症 (IPF) は、上皮細胞の損傷と、引き続く修復、治癒機転の異常が主要な病態と考えられており、化生上皮細胞及び筋線維芽細胞の増生が IPF 病態に関与する特徴的な病理学的所見である。これまで、我々は、IPF 肺組織では線維化進展部位を覆う化生上皮細胞の老化が亢進しており、オートファジーの低下が細胞老化の誘導により病態に関連している可能性を報告した。今回、IPF のもう一つの病理学的特徴である、筋線維芽細胞の増生に注目し、筋線維芽細胞分化におけるオートファジーの果たす役割について検討した。分離した線維芽細胞を用いた *in vitro* の検討では、オートファジー関連蛋白をノックダウンすると、筋線維芽細胞への分化が促進した。オートファジーの阻害剤、促進剤を用いた検討では、TGF- $\beta$  による筋線維芽細胞化の誘導に対して、オートファジーは抑制的に作用した。免疫組織学的検討では、IPF の早期線維化巣など線維化進展部位の筋線維芽細胞と考えられる細胞を中心に、p62 とユビキチン化蛋白の高発現を認め、一方、オートファジー関連蛋白の発現の亢進は認めず、IPF の線維芽細胞ではオートファジーが低下していると考えられた。オートファジーの低下が、IPF における筋線維芽細胞への分化を誘導促進し、病態に関与している可能性が示唆された。

## Involvement of autophagy in IPF pathogenesis (Autophagic regulation of myofibroblast differentiation)

Hiromichi Hara, Jun Araya, Kenji Kobayashi, Saburo Ito, Naoki Takasaka, Hiroshi Wakui, Yutaka Yoshii, Chikako Tsurushige, Jun Kojima, Kenichiro Shimizu, Takeo Ishikawa, Takanori Numata, Makoto Kawaishi, Keisuke Saito, Yumi Kaneko, Katsutoshi Nakayama, and Kazuyoshi Kuwano.

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

IPF is characterized pathologically by aberrant regeneration of metaplastic epithelial cells and proliferation of myofibroblasts, which may be attributed to abnormal wound repair process. Autophagy, a process that helps maintain homeostatic balance between the synthesis, degradation and recycling of organelles and proteins to meet metabolic demands, plays an important regulatory role in cellular senescence and differentiation. Here we examine the regulatory role of autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) pathogenesis. We test the hypothesis that myofibroblast differentiation is a consequence of insufficient autophagy. Using biochemical evaluation of *in vitro* models, we find that autophagy inhibition is sufficient to induce acceleration of myofibroblast differentiation in lung fibroblasts. Immunohistochemical evaluation of human IPF biospecimens reveals that fibroblasts in fibroblastic foci (FF) express both ubiquitinated proteins and p62. These findings suggest that insufficient autophagy is an underlying mechanism of myofibroblast differentiation and is a promising clue for understanding the pathogenesis of IPF.

**(はじめに)**

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis : IPF) は、慢性かつ進行性に肺実質の線維化をきたす予後不良の呼吸器疾患である<sup>1)</sup>。上皮細胞の損傷とそれに引き続く修復、治癒機転の異常が病態の中心と考えられている<sup>2-5)</sup>。損傷に関しては、アポトーシス、小胞体ストレスなどの関与が報告されている<sup>6-7)</sup>。一方、修復に関しては、形態的には化生上皮細胞と筋線維芽細胞の増生が病理形態学的特徴とされているが、その形成機序は未だ十分には解明されていない<sup>8)</sup>。

オートファジーはプロテアソーム系と共に、重要な細胞内蛋白分解機構の一つである<sup>9)</sup>。オートファゴソームと呼ばれるリン脂質の二重膜様構造からなる小胞を形成し、タンパク質や細胞小器官を囲い込み、リソソームと融合し内容を分解する。オートファジーは、古典的には飢餓時に誘導されるが、哺乳類では通常の状態でも基底レベルで働いており、新陳代謝や細胞内小器官の品質管理に関与している。様々なストレスやホルモン刺激により、オートファジーは誘導され、生理的なアミノ酸供給だけではなく、細胞内環境維持、免疫応答、感染症制御、発癌抑制、プログラム細胞死など、様々な病態においてもその重要性を示すことが知られている<sup>9)</sup>。オートファジーは、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、細胞老化制御において重要な役割を果たしていると考えられている<sup>10-11)</sup>。また、線維芽細胞において、オートファジーは type I collagen の細胞内分解亢進を介して線維化を抑制する可能性が報告されている<sup>12)</sup>。

昨年度は、IPF 肺組織の線維化進展部位を覆う化生上皮細胞の老化が亢進しており、オートファジーの低下が細胞老化の誘導により病態に関連している可能性を報告した。本年度は IPF のもう一つの病理学的特徴である、筋線維芽細胞増生におけるオートファジーの関与についての検討を行った。

**(対象と方法)****分離肺線維芽細胞を用いた検討**

肺癌手術患者由来の肺組織の正常部分より分離した肺線維芽細胞を用いて筋線維芽細胞分化におけるオートファジーの果たす役割について検討した。分離培養した線維芽細胞を TGF- $\beta$  で刺激し、筋線維芽細胞への分化を誘導した。筋線維芽細胞への分化は  $\alpha$ -smooth muscle actin(SMA) と type I collagen の発現により評価した。オートファジーの抑制には LC3, ATG5 の siRNA によるノックダウン、オートファジーの亢進には Torin1 を用いた。オートファジーは LC3 の活性化(LC3I から LC3-II への変換)により評価した。

**免疫組織学的検討**

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. オートファジーによる筋線維芽細胞分化抑制**

分離培養した線維芽細胞を TGF- $\beta$  で刺激すると、筋線維芽細胞へ分化し、 $\alpha$ -SMA と type I collagen の発現が亢進した。LC3B と ATG5 に対する siRNA を

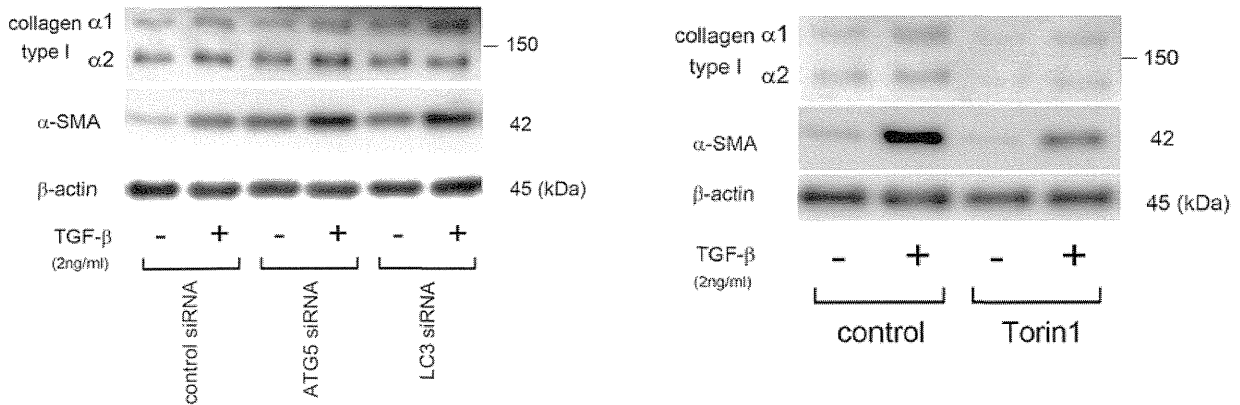


図1. オートファジー阻害, 亢進のTGF-βによる筋線維芽細胞分化に及ぼす影響

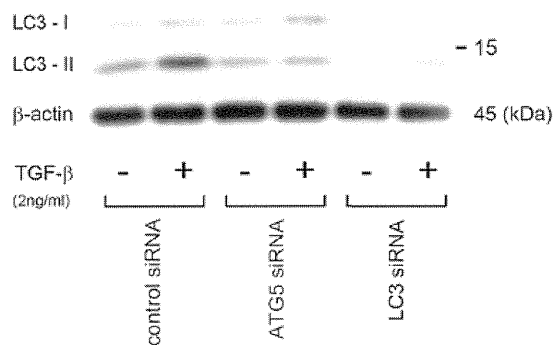


図2. TGF-βのオートファジーへ及ぼす影響

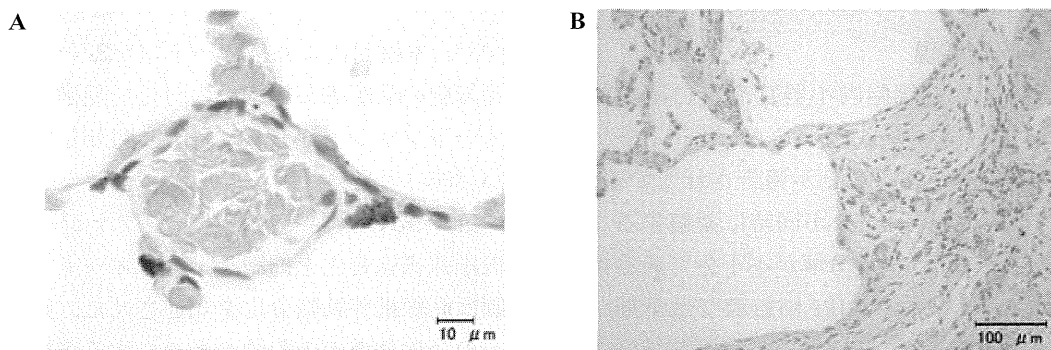


図3. 肺組織におけるLC3蛋白発現  
抗LC3抗体染色: A 正常構造領域 (IPF) B 軽度から中等度線維化部位 (IPF)

用いてオートファジーを抑制すると, TGF-βの刺激なしでもα-SMA と type I collagenの発現が亢進した. TGF-β刺激下では, オートファジの抑制はTGF-βによる筋線維芽細胞への分化をさらに促進した(図1左). 逆にmTOR阻害剤であるTorin1によるオートファジー亢進はTGF-βによる筋線維芽細胞化の誘導を抑制した(図1右). TGF-β刺激によりLC3-IIが増加し, オートファジーは亢進していた(図2). 一方

上皮細胞と異なり細胞老化に対する影響は認めなかった.

## 2. オートファジー関連蛋白 LC3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発現亢進を認めたが, 一方, 線維芽細胞では正常構造, 線維化進展の有無にかかわらずLC3の発現を認めなかった(図3).

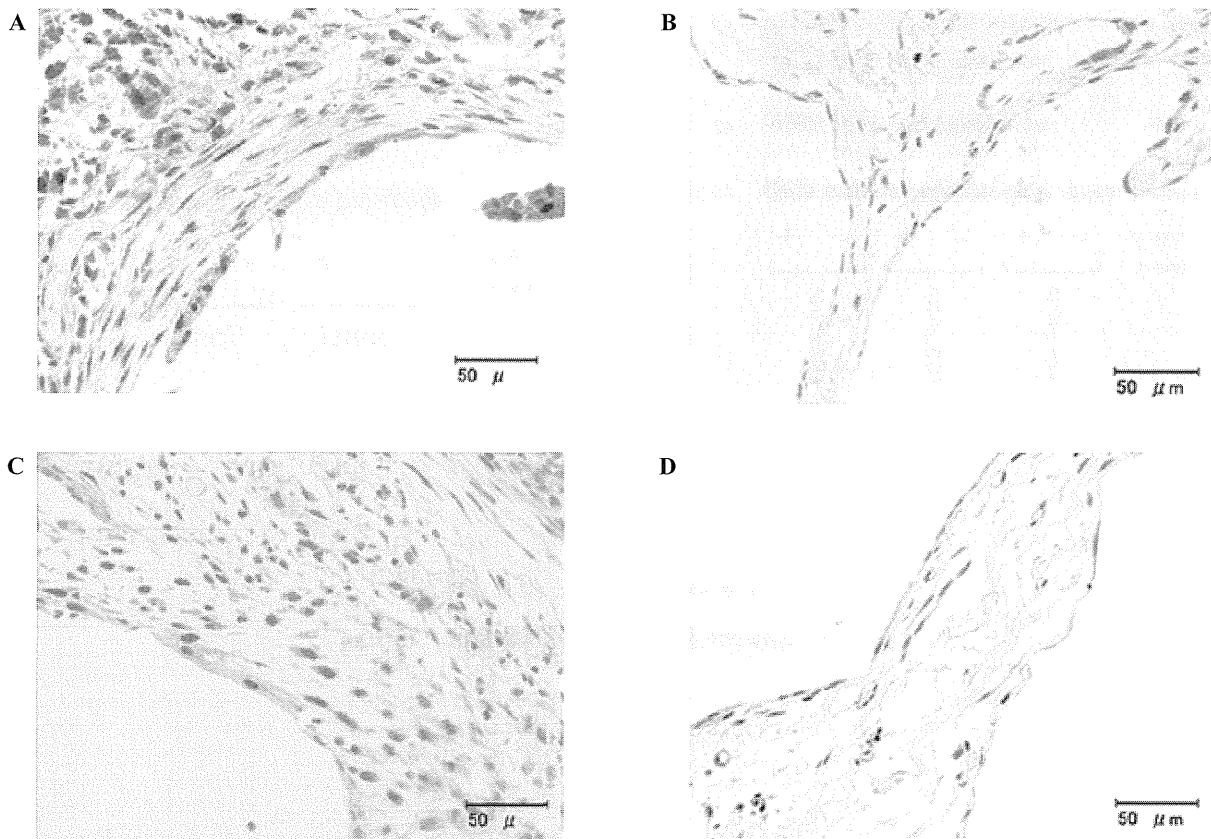


図4. 肺組織におけるp62とubiquitin発現  
 抗p62抗体染色：A Fibroblastic Foci (IPF) B 蜂巣肺部位 (IPF)  
 抗ubiquitin抗体染色：C Fibroblastic Foci (IPF) D 蜂巣肺部位 (IPF)

(図1から4は、文献18より引用、改変)

### 3. p62とユビキチン発現

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ている。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。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線維芽細胞にp62とユビキチン化蛋白の高発現を認め、特に早期線維化巣内での亢進を認めた。一方、高度に線維化進展した蜂窩肺の部位では線維芽細胞のp62とユビキチン化蛋白陽性細胞をわずかに認めるのみであった(図4)。

#### (考 察)

筋線維芽細胞への分化は、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの過剰産生と、その強い収縮能からIPFを含む各種線維化病態で中心的な役割を果たす<sup>13)</sup>。

本検討により、オートファジーの低下が線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を促進し、不十分なオートファジーがIPFの病態に関与している可能性が示唆された。

In vitroの検討では、オートファジーの亢進は筋線維芽細胞分化を抑制し、一方オートファジーの抑制は筋線維芽細胞分化を亢進させた。筋線維芽細胞への分化誘導の中心的な働きをする多機能サイトカインであるtransforming growth factor(TGF)-β刺激は筋線維芽細胞分化を促進する一方で、オートファジーを誘導した。すなわち、TGF-βによるオートファジー誘導は筋線維芽細胞分化に対しては内因性のネガティブフィードバックとして働いていると思われる。何らかの機序でオートファジーが低下するか、あるいはTGF-β存在下のオートファジー誘導が不十分であれば筋線維芽細胞分化がさらに促進される可能性がある。

免疫組織学的な検討では、IPFの早期線維化巣など線維化進展部位の筋線維芽細胞と考えられる細胞

を中心に、p62とユビキチン化蛋白の高発現を認め、一方、高度に線維化進展した蜂窩肺の部位では陽性細胞をわずかに認めるのみであった。またこれらの細胞にはSA- $\beta$ -galとp21の染色による細胞老化を認めなかった。これはIPFの線維芽細胞でもオートファジー機能が不十分であるが、上皮細胞とは異なり細胞老化は誘導されず、むしろ筋線維芽細胞への分化が促進されている可能性を示唆する所見と思われた。

以上より線維芽細胞でも、オートファジー機能が低下しているか相対的に不十分であることが、筋線維芽細胞への分化を促進によりIPF病態の背景に存在する可能性がある。オートファジーはtype I collagenの発現を細胞内分解亢進の機序で制御し、一酸化炭素によるオートファジー誘導が、TGF- $\beta$ 刺激によるtype I collagen蓄積を抑制することが腎臓のメサンギウム細胞を用いた検討でも報告されている<sup>12)</sup>。オートファジーは筋線維芽細胞分化、膠原線維の分解など、幾つかの機序を介して線維化に対し抑制的に作用しており、その破綻が線維化を促進する可能性があると考えられた。

Xiaらは、正常肺由来の線維芽細胞ではtype I collagenによる刺激で増殖が抑制されるのに対し、IPFの線維芽細胞では、 $\beta$ 1インテグリンの異常からPTEN活性が低下し、PI3K-Akt-S6K1系を介した増殖シグナルが異常に活性化していると報告している<sup>14)</sup>。PI3K-Akt-S6K1系の亢進はmTORの活性化を意味し、mTOR活性化はオートファジーを抑制することから、PTEN活性の低下がIPFにおける線維芽細胞のオートファジー低下を説明しうる機序の一つである可能性がある。またオートファジーの低下はミトコンドリアの恒常性の低下、傷害ミトコンドリアの蓄積、ROS産生を増加させる<sup>15)</sup>。ROS産生亢進は細胞老化<sup>16)</sup>、筋線維芽細胞分化<sup>17)</sup>いずれの病態にも関与しうる。オートファジーの役割が、上皮細胞に対しては細胞老化の制御に、また線維芽細胞に対しては筋線維芽細胞分化へと、それぞれ細胞特異的に作用する機序の詳細に関しても、オートファジー低下によるROS産生増加との関連性からさらに検討中である。

## (結 論)

オートファジーは筋線維芽細胞分化に対しては抑制的に作用し、オートファジーの低下が線維芽細胞の筋線維芽細胞化を促進することが、IPFの病態に関与している可能性が示唆された。

## (文 献)

- 1) Raghu G 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.
- 2) Gross TJ, et al: Idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med. 345: 517-25, 2001.
- 3) Harari S, et al: IPF: new insight on pathogenesis and treatment. Allergy 65: 537-53, 2010.
- 4) Selman M, et al: Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. Proc Am Thorac Soc. 3: 364-72. 2006.
- 5) Strieter RM, et al: New mechanisms of pulmonary fibrosis. Chest 136: 1364-70, 2009.
- 6) Kuwano K. Involvement of epithelial cell apoptosis in interstitial lung diseases. Intern Med. 47: 345-53, 2008.
- 7) Korfei M, et al: Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 178(8):838-46, 2008.
- 8) Chilosi M, et al: Abnormal re-epithelialization and lung remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis: the role of deltaN-p63. Lab Invest. 82(10):1335-45, 2002.
- 9) He C, et al: Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu Rev Genet. 43:67-93, 2009.
- 10) Rajawat YS, et al: Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system. Ageing Res Rev. 8(3):199-213, 2009.
- 11) Fujii S, et al: Insufficient autophagy promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease. OncoImmunology. 1(5):630-641, 2012.
- 12) Kim SI, et al: Autophagy Promotes Intracellular

Degradation of Type I Collagen Induced by Transforming Growth Factor (TGF)-beta1. J Biol Chem. 287(15):11677-88. , 2012.

13) Araya J, et al: Fibrogenic reactions in lung disease. Annu Rev Pathol.5:77-98, 2010.

14) Xia H, et al: Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. J Exp Med. 205(7):1659-72. , 2008.

15) Lee J, et al: Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. Biochem J. 441(2):523-40, 2012.

16) Zdanov S, et al: Establishment of H2O2-induced premature senescence in human fibroblasts concomitant with increased cellular production of H2O2. Ann N Y Acad Sci. 1067:210-6, 2006.

17) Amara N, et al: NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates

TGFbeta1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. Thorax. 65(8):733-8, 2010.

18) Araya J, et al: Insufficient autophagy in Idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 304(1):L56-69, 2013.

**(健康危険情報)**

なし

**(研究発表)**

Araya J et al Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2013 Jan;304(1):L56-69.

**(知的財産権の出願・登録)**

なし

# 肺線維症における Fibrocyte の effector cell としての役割の検討

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り、fibrocyte の effector cell としての役割について検討した。

【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<sup>3</sup>H-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 $\alpha$ -SMA 発現をウェスタンブロット法にて検討した。IPF 患者肺における fibrocyte からの増殖因子の発現について IPF 患者肺組織切片に対する免疫組織染色にて検討した。

【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 $\alpha$ -SMA の発現が亢進していた。IPF 肺において線維芽細胞巣を中心に fibrocyte が観察され、同細胞での各増殖因子の発現が確認された。

【考察】fibrocyte は増殖因子産生を介して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。



## 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]。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 [2]。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 I, 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, 3]。肺へ遊走した fibrocyte は、線維芽細胞に分化しコラーゲンをはじめとする細胞外基質を産生することにより肺線維化に関わっていると考えられているが、一方で最終形態として筋線維芽細胞まで分化するかどうかについてはまだ決着がつかない [4, 5]。Bucala らの最近のレビューにおいては、fibrocyte の炎症細胞としての役割や免疫調節作用が注目されている [6]。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フラスコにて約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 法を用いて検討した。放射線照射ヒト 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<sup>3</sup>H-チミジン取り込み試験を用いて検討した。また各増殖因子の阻害抗体を用いて fibrocyte 依存性ヒト肺線維芽細胞増殖反応の抑制効果を検討した。Fibrocyte 培養上清刺激

ヒト肺線維芽細胞 lysate を用いて  $\alpha$ -SMA, コラーゲン I 発現をウェスタンブロット法にて検討した。Fibrocyte 培養上清刺激肺線維芽細胞における  $\alpha$ -SMA, コラーゲン I 発現を各増殖因子の阻害抗体が抑制するか検討した。IPF 患者肺組織切片を用いた免疫組織染色にて FSP-1, CXCR4, 増殖因子に対する3重染色を行い、IPF 患者肺における fibrocyte の局在ならびに同細胞からの増殖因子の発現について検討した。

## 結 果

ヒト末梢血より分離した 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- $\beta$ 1, FGF-2, PDGF-BB の発現亢進がみとめられた (図1)。fibrocyte との共培養によりその細胞数依存性にヒト肺線維芽細胞は増殖反応を示した (図2)。TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB, FGF-2 に対する阻害抗体下に fibrocyte 依存性ヒト肺線維芽細胞の増殖反応について検討したところ、その増殖反応は PDGF-BB, FGF-2 阻害抗体により抑制された (図3)。続いて fibrocyte 培養上清, TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB, FGF-2 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ついて検討するためにウェスタンブロット法にて  $\alpha$ -SMA, コラーゲン I の発現を検討した。TGF- $\beta$ 1, FGF-2 刺激時と同様に fibrocyte 培養上清刺激にてヒト肺線維芽細胞での  $\alpha$ -SMA, コラーゲン I の発現亢進が確認された (図4)。各増殖因子に対する阻害抗体を用いて fibrocyte 培養上清刺激によるヒト線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を抑制するか検討したところ、TGF- $\beta$ 1, FGF-2 の阻害抗体によりヒト肺線維芽細胞での  $\alpha$ -SMA, コラーゲン I の発現が抑制された (図5)。IPF 患者肺組織切片における3重染色にて FSP-1+CXCR4+ 細胞 (fibrocyte) が線維芽細胞巢内ならびにその周辺を中心に分布しており、さらに同細胞が TGF- $\beta$ 1 を発現していることが確認された (図6)。FGF-2, PDGF-BB についても同様の結果が得られた (data not shown)。Fibrocyte 以外の増殖因子産生細胞としては再生上皮並びに肺胞マクロファージが認められた。

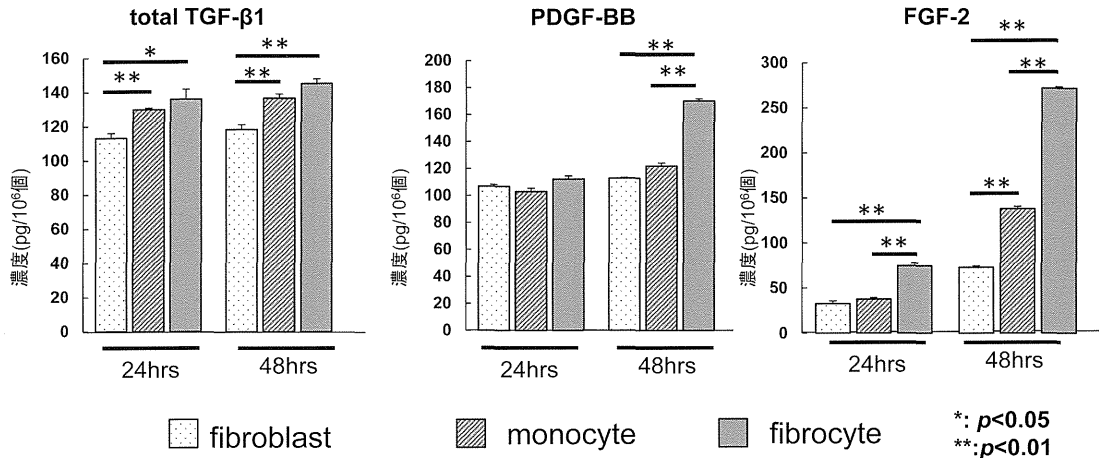


図1. ヒト fibrocyte からの増殖因子の産生  
Fibrocyte 培養上清中の増殖因子濃度を ELISA 法にて測定した. 培養時間依存性にヒト fibrocyte 培養上清中に TGF-β1, FGF-2, PDGF-BB の発現亢進がみられた.

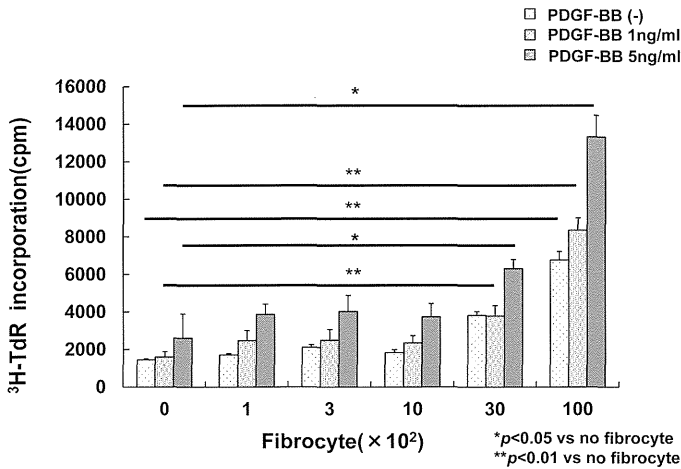


図2. Fibrocyte 培養上清刺激によるヒト肺線維芽細胞の増殖反応  
放射線照射 fibrocyte とヒト肺線維芽細胞の共培養を行い, <sup>3</sup>H-チミジン取り込み試験にて fibrocyte 刺激によるヒト肺線維芽細胞の増殖反応を検討した. Fibrocyte 刺激によりその濃度(個数)依存性に肺線維芽細胞が増殖反応を示した.

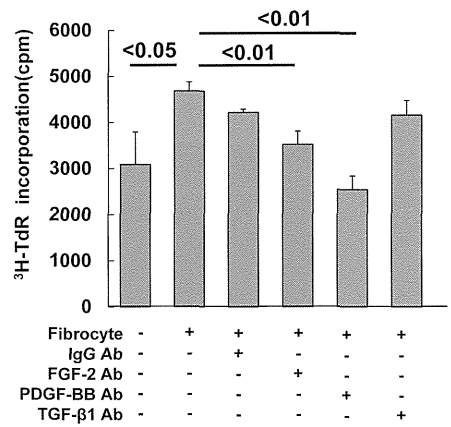


図3. Fibrocyte 共培養によるヒト肺線維芽細胞増殖反応に対するブロッキング抗体を用いた抑制反応の検討  
<sup>3</sup>H-チミジン取り込み試験にて増殖因子阻害抗体による fibrocyte 依存性ヒト肺線維芽細胞増殖反応の抑制効果について検討した. PDGF-BB, FGF-2 の阻害抗体によりその増殖反応は抑制された.

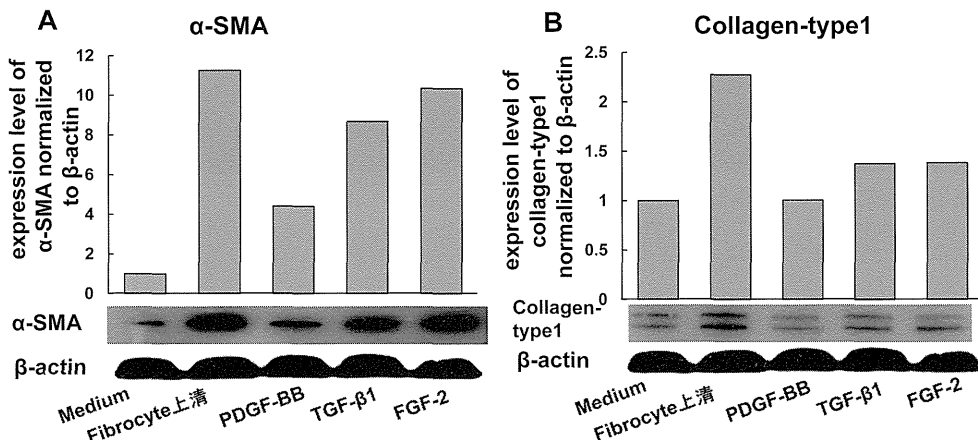


図4. Fibrocyte 培養上清刺激によるヒト肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化  
Fibrocyte 培養上清, TGF-β1, FGF-2, PDGF-BB 存在下にヒト肺線維芽細胞の培養を行い, 同細胞の lysate を用いてウェスタンブロット法にて α-SMA, コラーゲン I の発現について検討した. TGF-β1, FGF-2 刺激時と同様に fibrocyte 培養上清刺激によりヒト肺線維芽細胞における α-SMA, コラーゲン I の発現が亢進した.

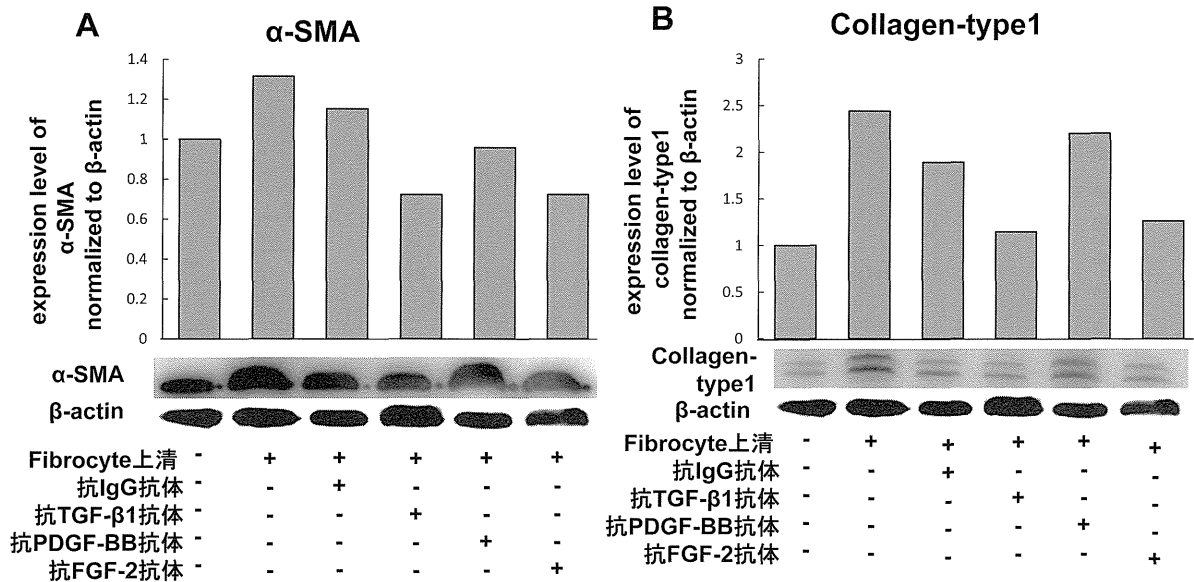


図5. Fibrocyte培養上清刺激によるヒト肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に対するブロッキング抗体を用いた抑制反応の検討  
Fibrocyte培養上清とともに各増殖因子の阻害抗体存在下にヒト肺線維芽細胞培養を行い、同細胞のlysateを用いてウェスタンブロット法にてα-SMA、コラーゲンIの発現について検討した。α-SMA、コラーゲンI発現をTGF-β1、FGF-2の阻害抗体が抑制した。

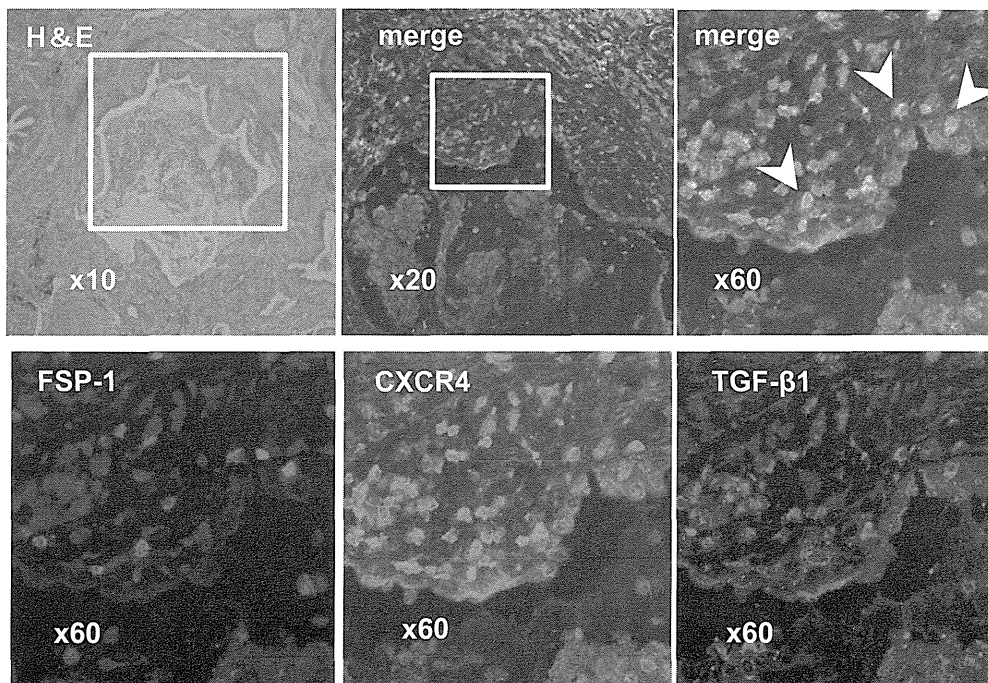


図6. IPF患者肺におけるfibrocyteからの増殖因子発現  
IPF患者肺組織切片においてFSP-1(紫)、CXCR4(緑)、TGF-β1(赤)に対する3重染色を行った。Merge像にて白色を呈するFSP-1+CXCR4+TGF-β1+細胞が認められ、fibrocyteからのTGF-β1発現が確認された。

## 考 察

FibrocyteはTGF-β1、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ということが示唆された。Wang

らにより熱傷患者末梢血から分離したfibrocyteが健康人由来の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いる[7]。また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

線維芽細胞巣周囲に fibrocyte が優位に集族していることが報告されている [8]。これらの報告は今回の結果と一致する内容であり、我々の仮説を裏付けている。以上から fibrocyte は肺において細胞外基質の産生のみならず、増殖因子産生を介して肺線維芽細胞を刺激し線維芽細胞巣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) McAnulty, R.J., *Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(4): p. 666-71.
- 2) Moeller, A., et al., *Circulating Fibrocytes Are an Indicator for Poor Prognosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2009.
- 3) 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.
- 4) Hashimoto, N., et al., *Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2004. **113**(2): p. 243-52.
- 5) 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.
- 6) Reilkoff, R.A., R. Bucala, and E.L. Herzog, *Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(6): p. 427-35.
- 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.