

ブレオマイシン誘発肺障害モデルマウスにおける ピルフェニドンの骨髄由来fibrocyte抑制効果に関する検討

猪俣 稔 神尾孝一郎 松田久仁子 國保 成暁
三浦由記子 林 宏紀 根井 貴仁 藤田 和恵
齋藤 好信 弦間 昭彦* 吾妻安良太**

背景: 特発性肺線維症(IPF)は細胞外マトリックスの異常沈着を来し、慢性かつ進行性に高度の線維化を来す予後不良な疾患である。IPFが線維化を来す機序の一つに骨髄由来fibrocyteの関与が指摘されているが、抗線維化薬であるピルフェニドン(PFD)のfibrocyteに対する作用は不明である。ブレオマイシン(BLM)誘発肺障害モデルマウスにてピルフェニドン(PFD)のfibrocyte抑制効果を検討した。

方法: C57BL/6マウスにBLMを投与し、PFDを14日間経口投与した。Fibrocyte(CD45, collagen I陽性細胞と定義)をflow cytometryと免疫組織染色で評価し、ELISAでCCL2とCXCL12の濃度を測定した。また、CCL2を免疫組織染色で評価した。

結果: Flow cytometryによる評価で、fibrocyteがBLM群の26.5%からPFD投与により11.2%へ減少、免疫組織染色でもfibrocyteの抑制が確認された($p=0.0097$)。ELISAでは、BLMによるCCL2上昇がPFD投与にて有意に抑制された($p=0.0003$)。CXCL12はBLMにより上昇し、PFD投与により抑制される傾向にあったが、有意差は認められなかった。BLM群におけるCCL2の免疫組織染色では、肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ、細気管支上皮において陽性所見を認めたが、これらはPFD投与により抑制される傾向にあった。

結論: PFDはBLM肺障害マウスにおける骨髄由来fibrocyteを抑制し、これにはPFDのCCL2抑制が関与することが示唆された。

日本医科大学 呼吸器・感染・腫瘍部門

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

** びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

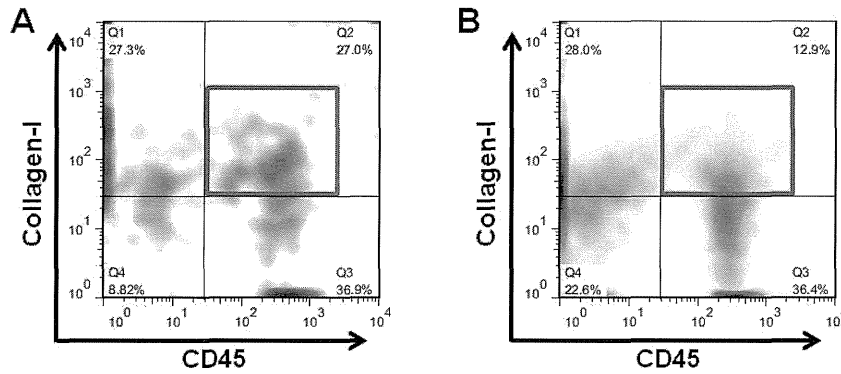


図1. CD45, collagen IによるFACS解析.
A: プレオマイシン (BLM) 単独群
B: BLM + pirfenidone (PFD) 併用群

【背景】

特発性肺線維症 (IPF) は細胞外マトリックスの異常沈着を来し、慢性かつ進行性に高度の線維化を来す予後不良な疾患である。IPF は進行に伴い usual interstitial pneumonia (UIP) パターンを呈し、過剰なコラーゲン産生、fibroblastic foci の出現などを認めるが、その病態はまだ解明されていない。肺に沈着する過剰な細胞外マトリックスは、肺線維芽細胞が産生していると考えられている。これまで、肺の線維化病態には肺内に存在する肺線維芽細胞や、上皮間葉移行 (epithelial mesenchymal transition: EMT) が関与すると考えられてきたが、肺へ遊走した骨髄由来の fibrocyte も線維化病態を形成すると考えられている¹⁾。

Fibrocyte は、fibroblast の前駆細胞と考えられる細胞の一つで、骨髄由来間葉系前駆細胞であり、白血球共通抗原、造血幹細胞マーカーを発現している²⁾。Fibrocyte は骨髄から肺内へ遊走し、肺の線維化病態に関与するとされている³⁾。IPF 患者、とくに IPF 急性増悪患者の末梢血中では、健常人と比較し fibrocyte が増加し予後とも関連しているという報告もある⁴⁾。

Pirfenidone (PFD) は IPF に対して世界で初めて承認された抗線維化薬である。その作用機序として、TGF- β 産生抑制やコラーゲン産生抑制作用、TNF- α 産生抑制作用などが報告されている⁵⁾が、その標的分子は未だ不明であり、明確な作用機序は解明されていない。

我々は *in vivo* にて、PFD の fibrocyte に対する抑制効果を検討した。

【方法】

C57BL/6 マウスにプレオマイシン (BLM) を投与し、PFD を 14 日間投与した。Fibrocyte (CD45, collagen I 陽性細胞と定義) を flow cytometry と免疫組織染色で評価し、ELISA で CCL2 と CXCL12 の濃度を測定した。また、CCL2 を免疫組織染色で評価した。

【結果】

PFD の fibrocyte に対する抑制効果

生理食塩水群、BLM 単独群、PFD 単独群、BLM + PFD 併用群の 4 群に分け、CD45, collagen I 陽性細胞を FACS で解析した。Fibrocyte は生理食塩水群で 9.4% であったのに対し、BLM 単独群では 27.0% と上昇したが、PFD 併用群で 12.9% と減少を認めた (図 1)。

PFD の fibrocyte に対する抑制効果の免疫組織染色

BLM 投与 14 日後のマウス肺では、生理食塩水群と比較し肺の線維化が認められた。CD45 と collagen I での免疫組織染色の結果では、BLM 群で fibrocyte の増加を認め (図 2)、BLM+PFD 併用群では有意に fibrocyte が減少していた (図 3)。

PFD による chemokine 抑制効果

ELISA による CCL2 濃度の検討では、生理食塩水群、PFD 単独群と比較し有意に CCL2 濃度が上昇していたが、PFD 併用によって有意に減少していた (図 4)。CXCL12 濃度に関しては、PFD 単独群と比較し BLM

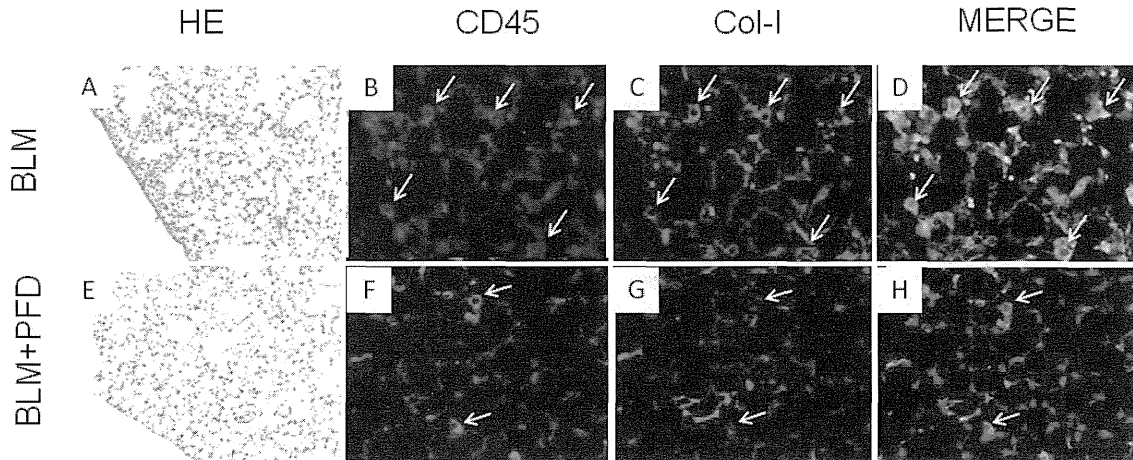


図2. CD45, collagen Iによる免疫組織染色

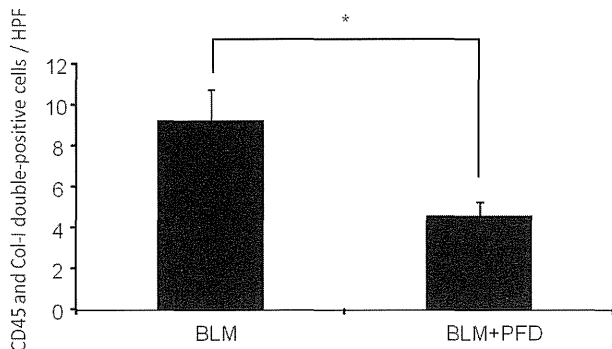


図3. CD45, collagen I陽性細胞(fibrocyte)数の比較

単独群で有意に上昇していた。BLM単独群と比較しBLM + PFD併用群では、CXCL12濃度に有意差は認められなかったが、減少傾向は認められた(図5)。

CCL2免疫組織染色

BLM単独群では、肺泡領域と細気管支領域において、特に肺泡上皮細胞、肺泡マクロファージ、細気管支上皮に発現の増強を認め、PFD併用によりCCL2発現は減弱していた(図6)。

【考 察】

PFDのfibrocyteへの効果に関してはこれまで報告されておらず、今回我々はBLM誘発肺線維症モデルマウスにおいて、PFDがfibrocyteを減少させることを示した。また、PFDがCCL2を抑制することが示されたため、CCL2の抑制を介してfibrocyteを減少させることがPFDの抗線維化作用の一つと考え

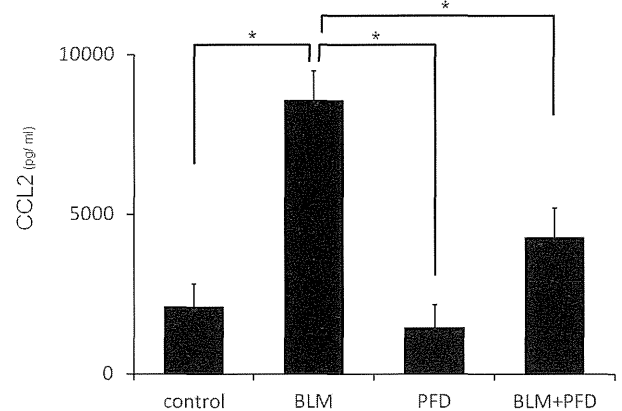


図4. CCL2濃度の比較

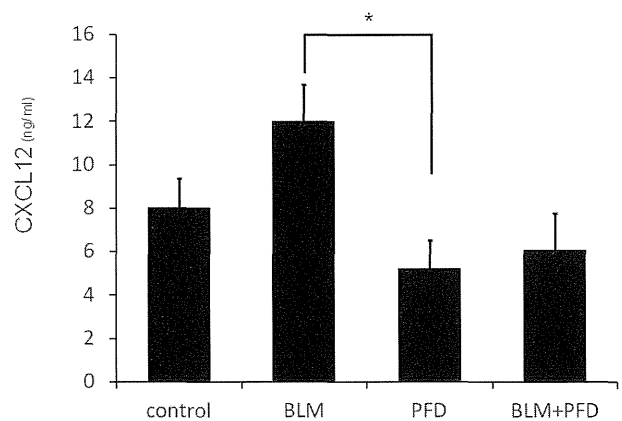


図5. CXCL12濃度の比較

られた。

Fibrocyteは骨髄由来間葉系前駆細胞であり、肺の線維化病態におけるmyofibroblastの起源と推測されている⁶⁾。Fibrocyteの末梢血中に占める割合は1%

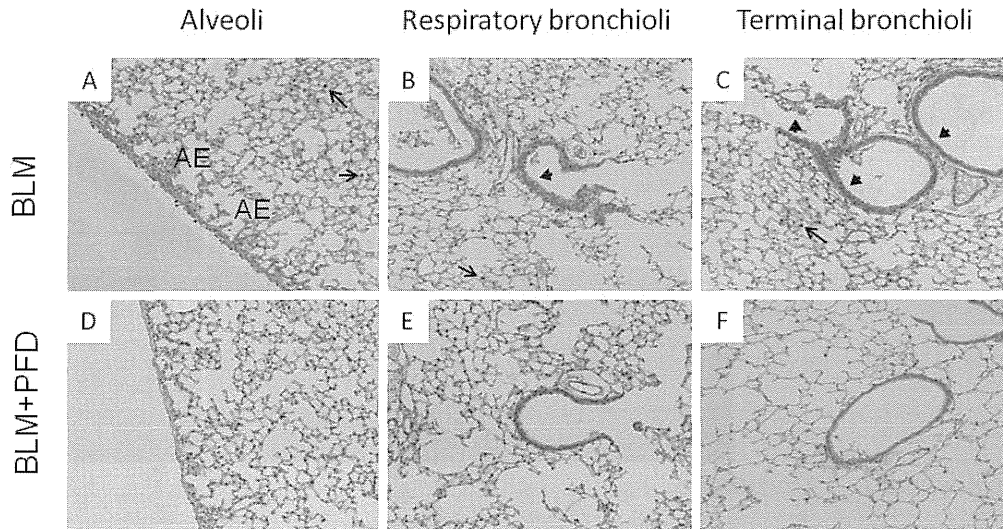


図6. CCL2の免疫組織染色

以下とされ、CD45やcollagen I陽性という特徴的なマーカーを有する細胞として定義されている⁷⁾。今回の実験では、PFD併用群でfibrocyteが減少していたことから、骨髄由来のfibrocyteを減少させることがPFDの抗線維化作用の一つと考えられた。

Fibrocyteの遊走に関与するchemokineとして、CCL2やCXCL12が重要とされている⁸⁾。CCL2濃度がPFD併用群で減少していたが、免疫組織染色から肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ、細気管支上皮での発現が減弱しており、PFDがこれらの細胞におけるCCL2の発現を抑制したためと考えられた。

PFDは未だ明確にその作用機序が解明されていない。今回の結果では、CCL2, fibrocyteの抑制効果が抗線維化作用の一つと考えられたが、PFDの作用機序についての検討がIPFの病態解明の一助となり、将来的にIPFの治療の発展につながることを期待される。

【参考文献】

- 1) Hardie WD, Glasser SW, Hagood JS. 2009. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol* 175: 3-16
- 2) Ebihara Y, Masuya M, Larue AC, Fleming PA, Visconti RP, Minamiguchi H, Drake CJ, Ogawa M. 2006. Hematopoietic origins of fibroblasts: II. In vitro studies of fibroblasts, CFU-F, and fibrocytes. *Exp Hematol* 34: 219-29
- 3) Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. 1998. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol* 160: 419-25
- 4) Moeller A, Gilpin SE, Ask K, Cox G, Cook D, Gauldie J, Margetts PJ, Farkas L, Dobranowski J, Boylan C, O'Byrne PM, Strieter RM, Kolb M. 2009. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 588-94
- 5) Oku H, Shimizu T, Kawabata T, Nagira M, Hikita I, Ueyama A, Matsushima S, Torii M, Arimura A. 2008. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol* 590: 400-8
- 6) Lama VN, Phan SH. 2006. The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond. *Proc Am Thorac Soc* 3: 373-6
- 7) Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. 1994. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1: 71-81
- 8) Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. 2004. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 114: 438-46

間質性肺炎・肺線維症における細気管支上皮細胞の 役割に関する研究

瀨田 直樹 横山 哲也 緒方 彩子 鈴木 邦裕
原田 知佳 前山 隆茂 猪島 一朗 中西 洋一*

【背景】肺線維化の初期事象は肺胞上皮の傷害と考えられており，肺線維症の研究は肺胞上皮細胞に着目したものが主である．以前，我々はマウスブレオマイシン(BLM)肺臓炎モデルにおいて，BLM投与初期には肺胞上皮細胞ではなく細気管支上皮細胞でHMGB1の発現が亢進し，その後，肺胞上皮細胞での発現が亢進してくることを示した．そこで肺線維化における細気管支上皮の役割に注目した．

【目的】マウスBLM肺臓炎モデルにおける細気管支上皮，その主構成細胞であるクララ細胞の果たす役割を明らかにする．

【方法】ナフタレン投与後，2日後のクララ細胞が脱落した状態のマウスに，BLMを気管内投与し，BLM投与14日後にBALを施行してBAL液の解析を行った．また肺を取り出して，HE染色，Elastica van Gieson(EVG)染色，免疫組織学的染色，TUNEL染色にて評価した．

【結果】ナフタレンを前投与しクララ細胞を脱落させた状態にBLMを投与したマウスでは，BLM単独投与群と比較して，HE染色にて肺臓炎の抑制，BALFにて総細胞数，リンパ球数，総蛋白量の有意な減少を認めた．またEVG染色と全肺コラーゲン量の低下から線維化の有意な抑制を認めた．クララ細胞数と全肺のクララ細胞特異的蛋白量に関してはBLM投与による有意な変化は認められなかった．またBLM投与により組織および肺胞洗浄液中でTGF- β やHMGB1の発現が亢進していたが，ナフタレン前投与により有意に抑制された．

【考察】ナフタレンにてクララ細胞を脱落させた状態のマウスでは，BLM肺臓炎が抑制されることを示した．クララ細胞と肺胞上皮細胞間には何らかのクロストークが存在し，間質性肺炎・肺線維症の病態に関与していると考えられた．以上より，細気管支上皮細胞が肺線維化において重要な役割を担っている可能性が示唆された．

A. 研究目的

肺線維症は肺胞上皮傷害を契機とする、不適切な修復の繰り返しの結果生じると考えられている。そのため肺線維症の病態解明に関する研究は、肺胞上皮細胞に着目したものが主であり、我々も肺胞上皮細胞の過剰なアポトーシスが肺線維症の原因のひとつであることを明らかにしてきた^{1,3}。その過程において、敗血症や急性肺傷害における遅発性メディエーターとして重要な High Mobility Group Box 1 (HMGB1) の間質性肺炎・肺線維症における役割に注目し急性期において重要と考えられていた HMGB1 が慢性肺疾患においても重要な役割を担っていることを明らかにした⁴。その研究において、マウスブレオマイシン (BLM) 肺臓炎モデルでは、BLM 投与初期には細気管支上皮細胞で HMGB1 の発現が亢進しているが、肺胞上皮細胞では高発現は認められず、投与3, 5日後になって、肺胞上皮細胞での発現が亢進しはじめ、その後線維化に進行していくこと、またこれらの病変は、抗 HMGB1 中和抗体投与により抑制されることを示した。肺胞上皮だけではなく、細気管支上皮も間質性肺炎・肺線維症において重要な役割を担っていると考えられ、更に、BLM 投与初期に細気管支上皮が傷害を受け、その後、肺胞上皮細胞に傷害が進んでいくことから、細気管支上皮と肺胞上皮間にクロストークが存在し、その破綻が肺線維化の一因になるのではないかと考えた。以上より、間質性肺炎・肺線維症における細気管支上皮細胞の役割に着目し研究を開始した。

B. 研究方法

ナフタレンを投与してクララ細胞を脱落させたマウスに BLM を投与し、炎症、線維化等に関する評価を、肺組織、気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL) 液の解析によって行った。

C57BL/6 マウス、雌、8 週齢に、corn oil で溶解したナフタレンを、1 匹あたり 200 mg 腹腔内投与 (intraperitoneal injection: ip) した。このモデルはナフタレン投与後 2-5 日後をピークにクララ細胞のほとんどが脱落し、14 日後にはほぼ自然再生するという広く使用されているモデルである^{5,6}。今回我々は、ナフタレン投与 (day -2) 後、2 日後 (day 0) のクララ

細胞が脱落した状態に BLM 2U/Kg を気管内投与 (intratracheal injection: it) し、BLM 投与 14 日後 (day 14) に BAL を施行し BAL 液の解析を行った。また肺を取り出して、HE 染色、Elastica van Gieson (EVG) 染色、免疫組織学的染色、TUNEL 染色にて評価した。これらの評価は①コントロール群 [コーンオイル (ナフタレンの溶媒) ip + 生理食塩水 (ブレオマイシンの溶媒) it 群]、②ナフタレン単独群 [ナフタレン ip + 生理食塩水 it 群]、③BLM 単独群 [コーンオイル ip + ブレオマイシン it]、④ナフタレン + BLM 投与群 [ナフタレン ip 群 + ブレオマイシン it 群]、それぞれの群の比較にて行った。

(倫理面への配慮)

九州大学動物実験実施規則に従って実験を行った。

C. 研究結果

クララ細胞傷害

クララ細胞の傷害に関しては、Clara cell 10-kD protein (CC-10) による肺組織の免疫組織学的染色と、ホモジネートした全肺のウェスタンブロット法にて評価した。組織学的には、day 14 における CC-10 陽性細胞数はナフタレン投単独群、ナフタレン + BLM 投与群ではコントロール群と比較して減少していた。ブレオマイシン単独投与群では、CC-10 陽性細胞数に変化を認めなかった。またナフタレン単独投与群とナフタレン + ブレオマイシン投与群との比較では、CC-10 陽性細胞数に有意な差を認めなかった。

次にウェスタンブロット法による全肺の解析では、CC-10 陽性蛋白はコントロール群と比較してナフタレン単独群とナフタレン + BLM 投与群で有意に減少していたが、ナフタレン単独群とナフタレン + BLM 群との比較では有意な差を認めなかった。また BLM 単独投与群ではコントロール群と比較して有意な差を認めなかった。

ナフタレン投与による BLM 肺臓炎の抑制効果

BLM を投与して 14 日後に組織学評価と、BAL 液の解析を行った。組織学的には、BLM 単独群と比較してナフタレン + BLM 投与群では有意にブレオマイシン肺臓炎は抑制されていた。BAL 液においては、コントロール群と比較して BLM 単独群では有意に

リンパ球数の増加と蛋白濃度の上昇が認められたが、これらはナフタレン+BLM群ではBLM単独群と比較して有意に抑制されていた。またBALF中のTGF- β 濃度はBLM単独群で有意に上昇を認め、ナフタレン+BLM群ではBLM単独群と比較して有意に抑制されていた。BALF中のHMGB1もナフタレン+BLM群ではBLM単独群と比較して有意に抑制されていた。また、アポトーシス陽性細胞に関して、BLM単独群では有意に増加していたが、それはナフタレン+BLM群では有意に抑制されていた。

次に線維化に関して、EVG染色とホモジネート肺のコラーゲン量にて評価した。コントロール群と比較してBLM単独群では有意にコラーゲン量が増加していたが、これはナフタレン+BLM群では有意に抑制された。ナフタレン単独投与群ではコラーゲン量に変化を認めなかった。

細気管支上皮細胞におけるTGF- β , HMGB1, IL-1 β の発現

細気管支上皮細胞における炎症性サイトカインや線維化促進因子の発現を検討するために、免疫組織学的にTGF- β , HMGB1, IL-1 β について主に細気管支上皮細胞に着目した解析を行った。ナフタレン単独群では、TGF- β , HMGB1, IL-1 β の高発現は認められなかったが、ブレオマイシン単独群ではTGF- β , HMGB1, IL-1 β の高発現を認めた。この高発現はナフタレン+BLM群では抑制されていた。

D. 考察

気道上皮傷害と肺胞機能低下の関係の詳細はいまだ不明であるが、気道上皮の傷害と修復の過程が肺胞機能低下を引き起こすと推定されている。以前我々はマウスBLM肺臓炎・肺線維症モデルにおけるHMGB1の発現に関する経時的解析⁴から、細気管支上皮細胞から肺胞上皮細胞へのメッセージの伝達、即ち、細気管支上皮と肺胞上皮との間にクロストークが存在するのではないかと推定した。

まず今回の我々の研究結果から、クララ細胞が脱落した状態のマウスにBLMを経気管投与するとBLM肺臓炎・肺線維症が抑制されたことにより、初期に損傷されるクララ細胞がそもそも存在しない状態では、クララ細胞から肺胞上皮細胞への負の

メッセージが伝達されず、肺臓炎・線維化の発症が抑えられたのではないかと考えた。これは細気管支上皮と肺胞上皮間にクロストークが存在するという我々の推測を裏付ける結果と考えられた。

次に、一般にクララ細胞は、COPDや気管支拡張症などでは発現が低下したり⁷、炎症性サイトカインやケモカインの産生や活性化を制御したり⁸と、生体にとって有益な働きをしており、その機能低下は疾病に繋がると考えられている。実際、我々はマウスナフタレン肺傷害モデルにゲフィチニブの内服を併用することにより、急性肺傷害が遷延することを報告し⁶、クララ細胞の機能が低下した状態ではゲフィチニブによる急性肺傷害が増悪することを明らかにした。しかし、今回の我々の研究結果は、クララ細胞が存在するとブレオマイシン肺臓炎が増悪するとも言え換えられるため、疾患によってはクララ細胞は病態を増悪させる因子としての働きも併せもつ可能性を示しており、実に興味深い研究結果であると考えている。

また、クララ細胞はクララ細胞自身への再生能のみならず肺胞上皮細胞への再生能ももつと報告されており注目されているが⁹⁻¹⁰、そのstem cellやprogenitor cellとしての働きの面から、肺線維化の成因を検討することも重要である。クララ細胞もしくは同じく細気管支に存在すると報告されている細気管支肺胞上皮幹細胞¹⁰から、クララ細胞や肺胞上皮細胞が再生してくる過程における異常が、肺線維化の原因となっている可能性は十分に考えられる。また、ブレオマイシン肺臓炎はブレオマイシン投与後、day7辺りまでの炎症期、それ以降の線維化期が存在するが、今回の我々の実験系においては、炎症期においても線維化期においても、ナフタレンにより脱落したクララ細胞の再生過程が重なるため、クララ細胞の再生過程において重要な働きをもつと考えられる成長因子、サイトカイン、その他未知の重要な物質が、炎症期のみか線維化期のみか、その両方の期に渡ってか、肺臓炎・線維化を制御している可能性も推察される。現時点における今後の検討課題と考え研究を進めていく方針である。

E. 結論

マウスにおいて、ナフタレンにてクララ細胞を脱

落させた状態では、ブレオマイシン肺臓炎が抑制されることを示した。そのメカニズムは不明であるが、クララ細胞と肺胞上皮細胞間に何らかのクロストークが存在し、間質性肺炎・肺線維症の病態に関与している可能性があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 緒方彩子, 前山隆茂, 濱田直樹, 横山哲也, 鈴木邦裕, 有森陽二郎, 麻生達磨, 原田英治, 高山浩一, 中西洋一. サルコイドーシスと原発性肺癌を合併した6症例の臨床的検討 日本呼吸器学会誌 1: 95-101, 2012

2. 学会発表

- 1) Yokoyama T, Suetsugu-Ogata S, Hamada N, *et al.* The Role of Clara Cell In Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis In Mice. American Thoracic Society International Conference. May 16-19, 2012. San Francisco. USA
- 2) Maeyama T, Yokoyama T, Suzuki K, *et al.* Anti-Apoptotic Effect Of Pirfenidone On Murine Lung Epithelial Cells In Vitro. American Thoracic Society International Conference. May 16-19, 2012. San Francisco. USA
- 3) Suzuki K, Mikumo H, Yokoyama T, *et al.* Bax Inhibiting Peptide Decreases The Apoptosis Of Murine Pulmonary Alveolar Epithelial Cells In Vitro. American Thoracic Society International Conference. May 16-19, 2012. San Francisco. USA

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

- 1) Hagimoto N, Kuwano K, Nomoto Y, *et al.* Apoptosis and expression of Fas/Fas ligand mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell and Mol Biol.* 1997;16:91-101.
- 2) 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;17:272-278.
- 3) Kuwano K, Hagimoto N, Kawasaki M, *et al.* Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 1999;104(1):13-19.
- 4) Hamada N, Maeyama T, Kawaguchi T, *et al.* The role of high mobility group box1 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39:440-447.
- 5) Stripp BR, Maxson K, Mera R, *et al.* Plasticity of airway cell proliferation and gene expression after acute naphthalene injury. *Am J Physiol.* 1995;269:791-799
- 6) Harada C, Kawaguchi T, Ogata-Suetsugu S, *et al.* EGFR tyrosine kinase inhibition worsens acute lung injury in mice with repairing airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:743-751
- 7) Gray RD, MacGregor G, Noble D, *et al.* Sputum proteomics in inflammatory and suppurative respiratory diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:444-452
- 8) Broeckaert F, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin Exp Allergy.* 2000;30:469-475
- 9) Reynolds SD, Giangreco A, Hong KU, *et al.* Airway injury in lung disease pathophysiology: selective depletion of airway stem and progenitor cell pools potentiates lung inflammation and alveolar dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287:1256-1265
- 10) Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, *et al.* Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell.* 2005;121:823-835

抗酸化力を利用した水素分子治療による 肺障害の抑制と応用

寺崎 泰弘 鈴木 徹也 大澤 郁朗 漆山 博和 寺崎 美佳
高橋美紀子 功刀しのぶ 石川吾利美 桑原 尚美 福田 悠*

背景：水素分子(H₂)の抗酸化作用はヒドロキシラジカル(\cdot OH)などの酸化力が強い活性酸素種への選択的還元性と高い生体膜通過性を特徴とし臨床応用が期待されている。

方法，結果：放射線肺障害は \cdot OHが主な傷害活性酸素種である為，H₂による障害抑制効果を培養細胞と動物モデルで検討した。H₂添加によりヒト肺胞上皮細胞に放射線照射で産生される \cdot OHの低下がESR解析で示され，8-OHdGの定量やcaspase3発現解析などから酸化ストレスとアポトーシスの増大が抑制されていた。放射線肺障害マウスモデルでも8-OHdGやTUNEL染色，Bax発現解析から照射後1週間の急性期でH₂処理群(照射時3% H₂吸入，以後H₂水自由飲水)の肺で抗酸化や抗アポトーシス効果を認め，照射後5ヶ月の慢性期にはH₂処理群で肺線維化の減少が認められた。

一方，H₂水の飲水のみでマウスでの抗がん剤シスプラチンによる腎毒性が抑制される。そこで，肺がん治療薬ゲフィチニブの副作用である肺障害へのH₂水飲水による抑制も検討した。ナフタレンをマウス腹腔内に投与し気道上皮に傷害を与え，更にゲフィチニブを1週間経口投与し傷害が増強するゲフィチニブ副作用肺障害モデルを作製した。肺障害増悪による体重低下やBALF中や肺組織気道周囲での炎症細胞増加がH₂水飲水群で有意に抑制された。

結論：H₂治療により放射線肺障害やゲフィチニブ肺障害が抑制された。H₂摂取の安全性は高いことから，早期の臨床応用が期待できる。

【背景】

水素分子(H₂)は還元物質として、燃焼により酸素と反応して水になる。H₂は最小分子で電子分布に偏りが無い為、両親媒性で拡散速度が速く、細胞膜を通過して核やミトコンドリアへ容易に到達できる。我々のグループはH₂のこの還元力(抗酸化力)や拡散力に着目し、H₂は生理的機能も担う酸化力が弱いO₂・やH₂O₂は還元せず、hydroxyl radicals(・OH)やパーオキシナイトライト(ONOO-)などの酸化力が強い活性酸素種(ROS)を選択的に還元することを無細胞系や培養細胞系で示した。さらにH₂が細胞死を容量依存的に抑制する事も報告した(1)。以降、虚血再灌流障害(脳、心、肝、網膜など)(2-4)、薬剤性障害(脳、腎など)(5)など様々な酸化ストレス障害動物モデルでH₂による障害抑制効果が示され、副作用の少ないこれまでにないタイプの独創的な抗酸化剤としてその臨床応用が期待されている。

一方、多様な呼吸器疾患の病態には酸化ストレスの関与が強く示唆されており、その効果的な除去は疾患治療における新たな手段となる。

電離放射線は生体内水分子と反応し active free radicals, ROSを発生し細胞傷害を起こすが、その60-70%は傷害性の強いROSである・OHによる障害である事が知られている(6)。放射線肺障害も、照射中に生じるこの・OHなどによる急性傷害と、その後持続する酸化ストレスなどによる傷害の病変として知られている(7, 8)。従って放射線肺障害では酸化ストレスの効果的除去がその障害抑制に重要であり、実際 free radical scavengerによる放射線肺障害の抑制の報告が数多くある(9)。しかし、効果、毒性、耐性、選択性などから、臨床的に有効な理想的な放射線障害防御剤は見いだされていない為、まず放射線肺障害でのH₂治療の抑制効果を肺上皮培養細胞と動物モデルで検討した。

また、肺がん治療薬であるゲフィチニブは分子標的薬として優れた効果を発揮するが、一方で急性肺障害などの副作用が知られており、年齢、喫煙歴、慢性間質性肺炎の合併などが増悪させる危険因子として指摘されている(10)。ゲフィチニブ副作用肺障害モデルとしてナフタレンとゲフィチニブの併用によるマウス気道障害モデルの報告があり、クララ細胞障害に加え好中球など炎症細胞浸潤が増強する(11)。

加齢や喫煙、間質性肺炎の病態にも酸化ストレスの病態が関与するが、水素分子を高濃度に含む水(H₂水)の飲水だけでも抗酸化、抗炎症作用がみられ(12)、実際H₂水飲水は抗がん剤シスプラチンの腎毒性を抑制する(5)。よってH₂水飲水によるゲフィチニブ肺障害への抑制効果についてもナフタレン・ゲフィチニブによるマウス気道障害モデルを用いて検討した。

【方法】

1) H₂-rich PBS, 培地およびH₂水の作製

H₂-rich PBSと培地(H₂ treatment(+))はH₂と空気の混合ガス(50%/50%, vol/vol)で飽和させて作製し、コントロールのN₂-rich PBSと培地(H₂ treatment(-))はN₂と空気の混合ガス(50%/50%, vol/vol)で飽和させて作製し、直後にそれぞれの混合ガスを充填して密閉した。H₂水(H₂ treatment(+))も100%H₂ガスを飽和させて作製し、直後にH₂ガスを充填して密閉した。コントロール水は、H₂水を4時間大気中で開放換気してH₂をパージすることで作製した。

2) 放射線照射により生じるROS(・OH)の測定

a) Electron spin resonance (ESR)

上記の1)で作製直後のH₂-richおよびN₂-rich PBSにDMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide; free radical, ・OH trapper)を加え、それぞれ作製ガスを充填密閉したチャンバーに放射線10Gを照射し、10分後にDMPO-OHとしてのESRシグナル強度をJES-RE3X(ESR signals detector)を用い測定した。

b) Fluorescent indicator (HPF)

培養肺上皮細胞A549の培地を1)で作製直後のH₂-richおよびN₂-rich PBSに置換し2-[6-(4'-hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoate(HPF)およびHoechst 33342 dyeを加え、それぞれ作製ガスを充填密閉したチャンバー内の細胞に放射線10Gを照射し、15分後に再度同様にPBSを入れ替えてガス充填後密閉し、さらに15分後に細胞内・OHとしてのシグナルをHPFの蛍光緑発色として観察測定した。

3) 放射線照射した肺上皮細胞の傷害評価

培養上皮細胞の放射線による酸化ストレス、アポトーシス、傷害状況を評価するため、8-OHdG, 4-HNE, active caspase3およびBaxの各抗体による免疫蛍光染色とWestern blot法, propidium iodide(PI; 死細胞 pink)とHoechst 33342(死細胞および生存細

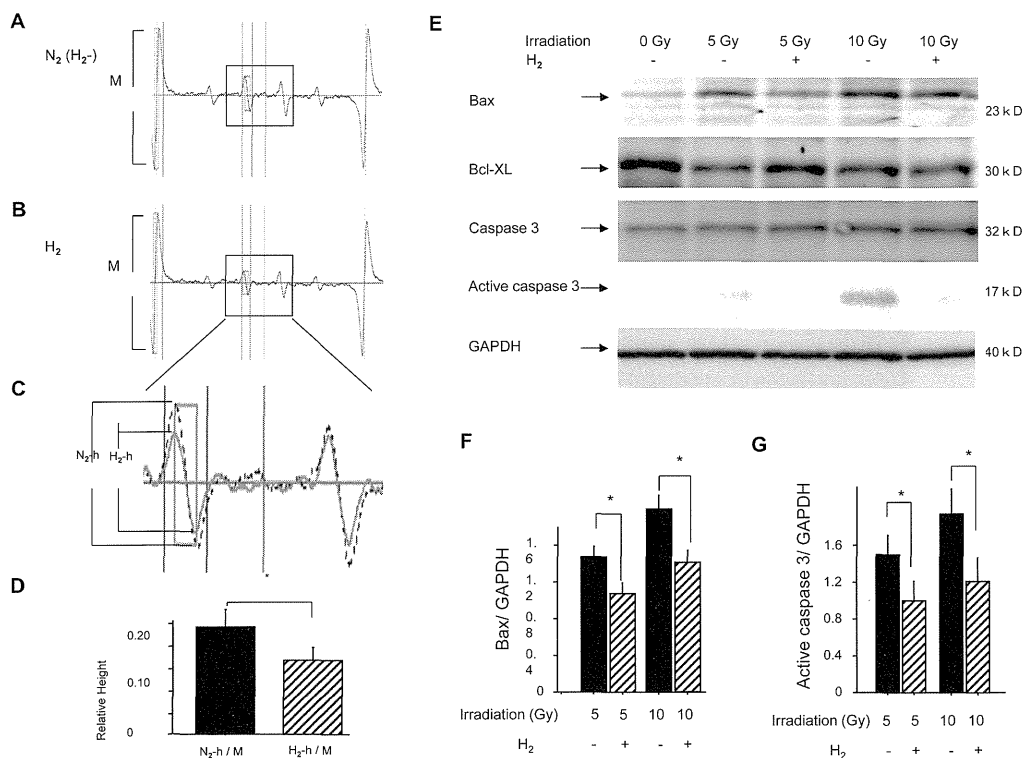


図1. Reduction by H₂ of irradiation-induced •OH in media and Effects of H₂ on modulation of apoptotic marker proteins in irradiated cells.

胞, blue)による細胞染色法での観察を行った。

4) 放射線肺障害マウスモデル作製

生後7週齢の雌マウス(C57BL/6J)胸部に15Gyの放射線を90分照射した。H₂-treatment (+) 群は照射中3% H₂を吸入後、H₂水を解析時まで自由飲水させた。H₂-treatment(-) 群は照射中3%N₂を吸入後、コントロール水を自由飲水させた。

5) 放射線肺障害マウスモデルの解析

a) Acute phase (照射後1,2,3,7日)では病理学的検索としてHE染色の他、8-OHdGの免疫染色とTUNEL染色を行った。障害モデルの凍結肺を材料としlipid酸化ストレス指標としてMDAを測定し、Bax, TGF-β1の発現量をWestern blot法にて解析した。

b) Late phase (照射後5ヵ月)ではMicro-computed tomography (micro-CT)で胸部全体の障害状況を観察し、病理学的検索としてHE染色の他、EMG染色でAshcroft scoreを測定し、Type III collagenの免疫染色を行った。

6) ナフタレン・ゲフィチニブ気道障害マウスモデル作製

生後7週齢の雌マウス(C57BL/6J)を用い、Day0でナフタレン(記号:N)もしくはコーン油(記号:CO)を200mg/kgで腹腔内に投与した。ゲフィチニブ

ブ(記号:G)はゾンデを用いて、同様にDay0からDay6までの1週間、200mg/kgで経口投与し、副作用モデルマウスを作製した。この間、H₂水(記号:H)もしくはコントロール水(記号:C)をDay0から1週間自由摂取させ、(1)コーン油のみ(oil), (2)ナフタレン+脱気水(N+C), (3)ナフタレン+H₂水(N+H), (4)ナフタレン+脱気水+ゲフィチニブ(N+C+G), (5)ナフタレン+H₂水+ゲフィチニブ(N+H+G)の5群に分けて検証を行った。

7) ナフタレン・ゲフィチニブ気道障害マウスモデルの評価

Day0, Day4, Day7における体重の推移、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の細胞数計測、病理学的検索としてBALFのギムザ染色、肺組織のHE染色とクララ細胞(CCSP)の免疫染色を行った。

【結 果】

1) 培養肺上皮細胞 (in vitro) におけるH₂治療の放射線障害抑制効果

ESR解析よりH₂は放射線によるPBS内の•OH産生を抑制し(図1 A-D), HPF signals解析よりA549 cell内においても放射線による•OHの産生を抑制した。

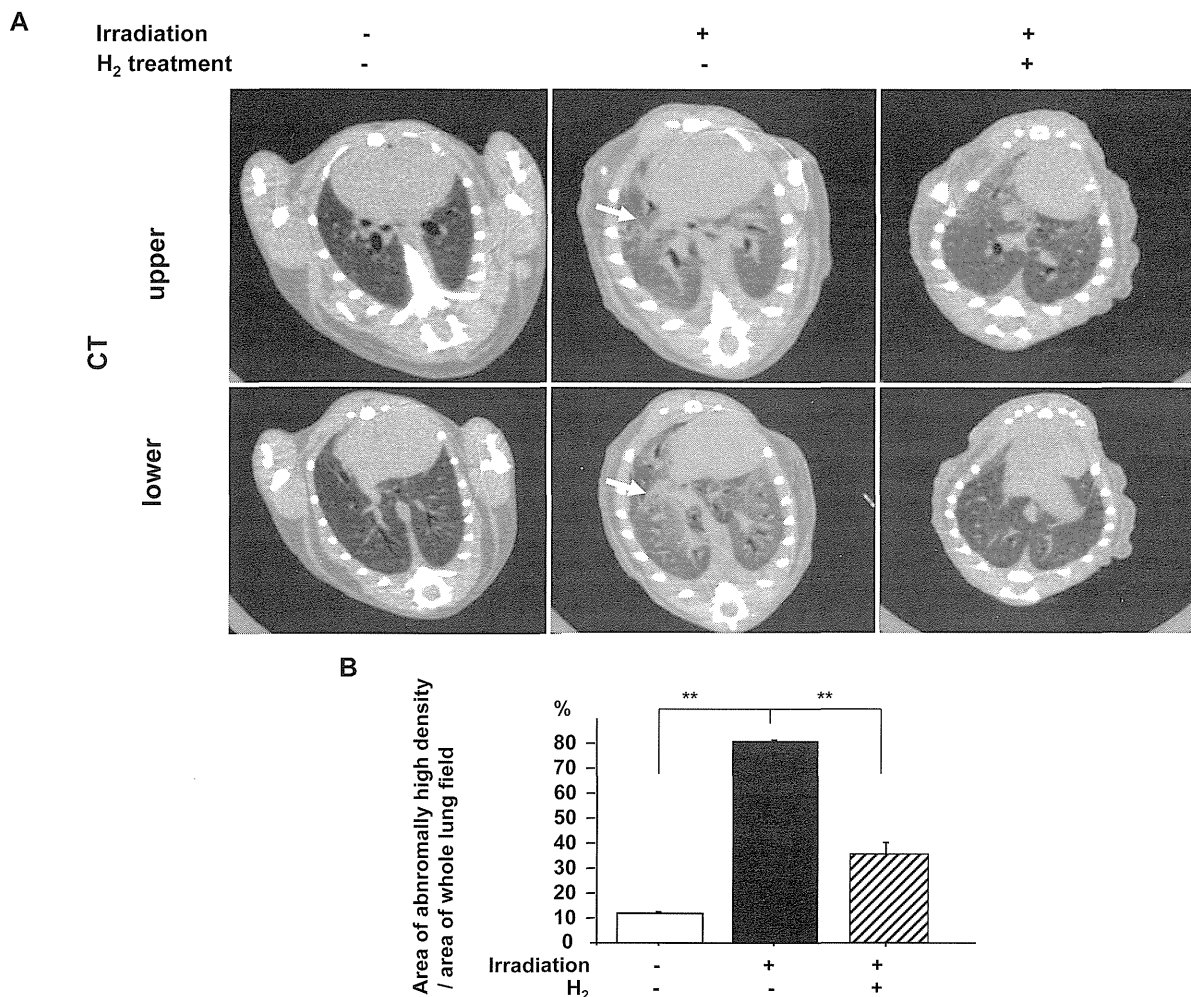


図2. Reduced irradiation-induced lung fibrosis (late lung damage) in mice by H₂ treatment. CT findings.

また8-OHdG及び4HNEに対する免疫染色からH₂はA549細胞において放射線による酸化ストレスを軽減し、さらにActive caspase3, BaxのImmunoblot解析(図1 E-G), Bax translocation解析, PIとHoechstの2重蛍光発色解析からH₂は放射線によるアポトーシスを介した細胞死を軽減した。

2) マウスモデル (in vivo) におけるH₂治療の放射線障害抑制効果

放射線照射後7日以内の急性肺障害期では、コントロールの放射線障害肺では8-OHdGやTUNEL染色陽性となる酸化ストレス亢進やアポトーシスの所見が観察されたがH₂治療はこれを軽減した。MDA, BaxおよびTGF-β1の発現解析でも放射線照射で見られる肺内の酸化ストレス亢進やアポトーシスの所見がH₂治療で軽減された。放射線照射後5ヵ月の慢性肺障害期で見られる線維化もChest micro-CT(図

2), Ashcroft scoreおよびType III collagen解析(図3)の結果から、H₂治療で有意に軽減されていた。

3) ナフタレン・ゲフィチニブ気道障害におけるH₂治療の抑制効果

ナフタレン単独でも4日後に顕著な体重低下がみられ、1週間後には軽度であるがBALF中の細胞数増加、肺組織クララ細胞の減少、周囲炎症細胞浸潤がみられたが、ナフタレンにゲフィチニブを併用した副作用モデルでは、いずれもこの変化が増悪した。マウスへのゲフィチニブ単独投与で大きな病変は観察されなかった。ナフタレン・ゲフィチニブ副作用モデルマウスで1週間以内にみられる体重低下はH₂水投与で有意に抑制された(図4A)。副作用モデルマウスでは1週間以内に20%のマウス死亡率を伴ったが、H₂水投与群では死亡した個体はなかった。副作用モデルマウスで見られるBALF中の細胞数の

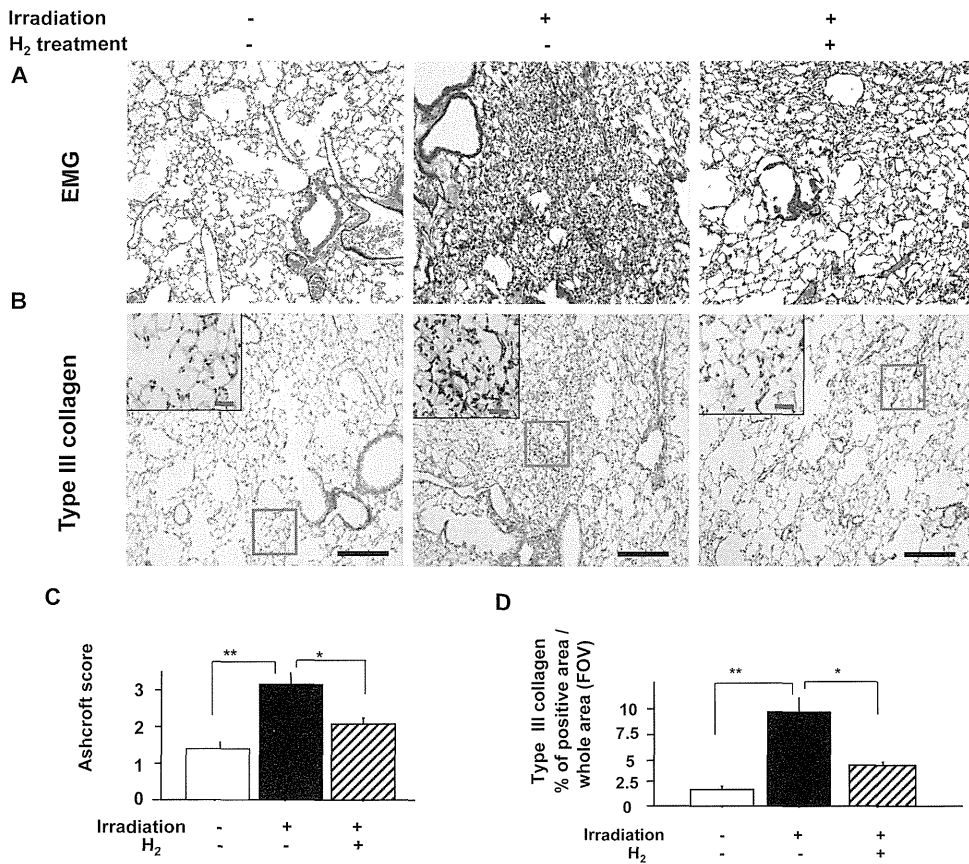


図3. Reduced irradiation-induced lung fibrosis (late lung damage) in mice by H₂ treatment. Ashcroft score and Type III collagen.

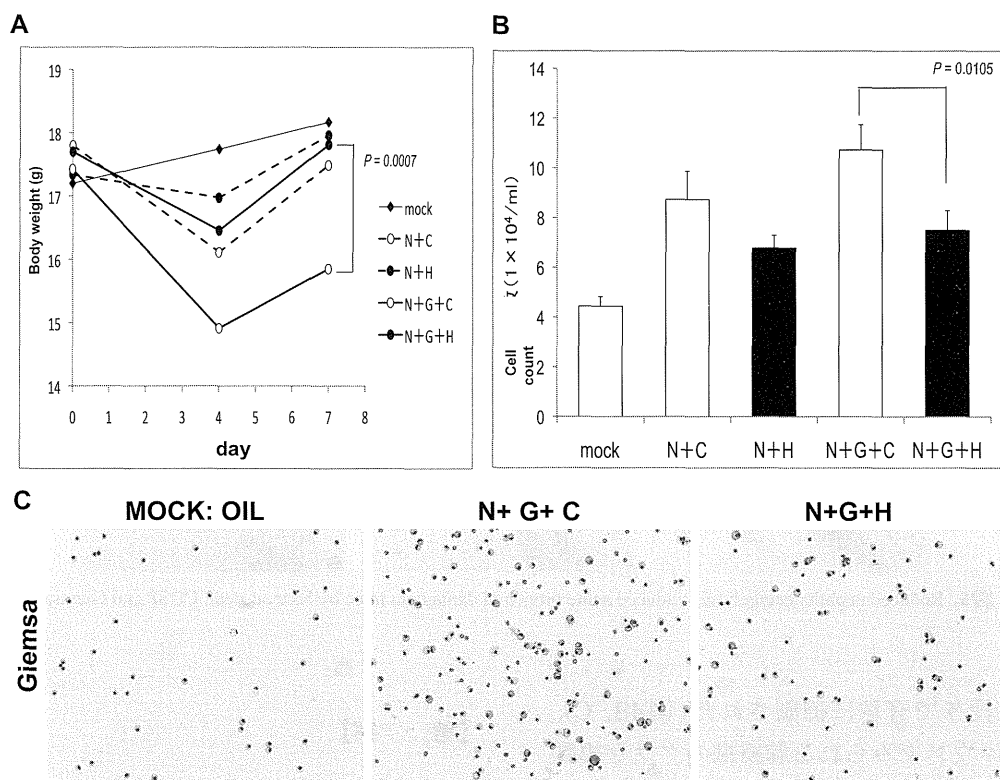


図4. Effects of H₂ water on body weight and bronchoalveolar lavage fluid cell counts of mice over time treated with naphthalene and gefitinib.

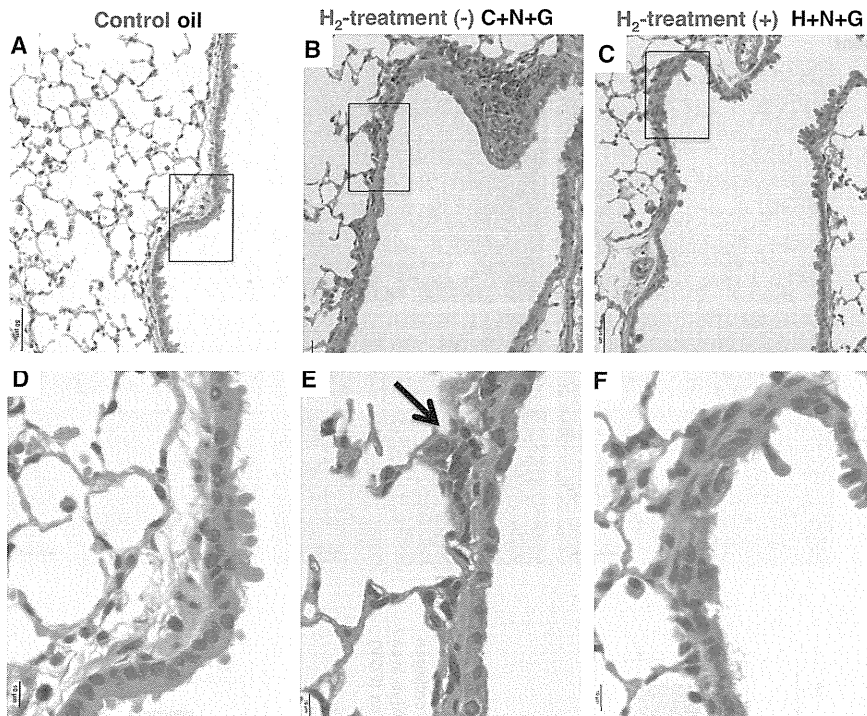


図5. Reduced naphthalene/gefitinib-induced acute bronchial damage in mice by H₂ treatment. HE

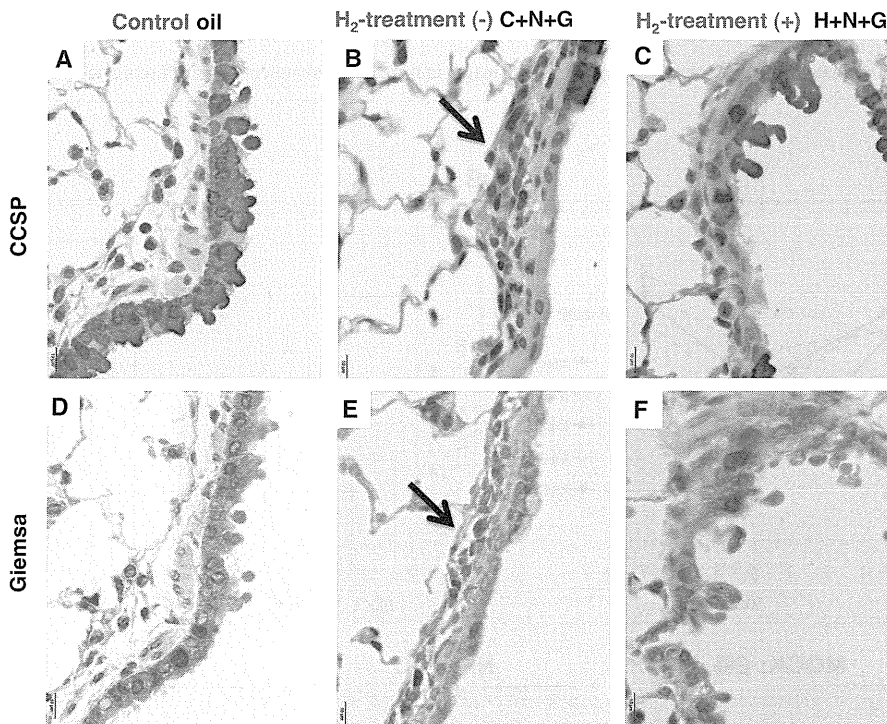


図6. Reduced naphthalene/gefitinib-induced acute bronchial damage in mice by H₂ treatment. CCSP and Giemsa

増加は水素水投与で有意に抑制された(図4B, C).
副作用モデルマウスで見られる肺組織のクララ細胞
の減少, 周囲炎症細胞浸潤(矢印)は, H₂水投与で
抑制された(図5, 6).

【考 察】

H₂の抗酸化作用は・OHなどの選択的還元性と高い生体膜通過性によるものと考えられるが, 一方で,

H₂水飲水による慢性酸化ストレス疾患の治療モデルでは酸化力の強いROSを還元する以外の作用機序が存在する可能性も報告され、その臨床応用が期待されている(12)。多様な呼吸器疾患の病態には酸化ストレスの関与が強く示唆されているが、今回は特に・OHが主な障害ROSである放射線肺障害と、急性肺障害の副作用が問題となる肺がん治療分子標的薬ゲフィチニブの肺傷害についてH₂治療の効果を検討した。

1)放射線肺障害について

我々はまず実際に放射線によってPBS内に・OHが産生されH₂によってその産生が抑制される事をESR解析より直接確認した(図1A-D)。さらに培養肺上皮細胞A549内においても同様に放射線によって産生される・OHがH₂によって抑制する事をHPF signals解析より確認した。これはフェントン反応で産生される・OHやミトコンドリア呼吸鎖複合体III酵素阻害剤で誘発される細胞内発生・OHがH₂処理で抑制されたとする以前の報告と矛盾しない(1)。また抗8-OHdG及び4HNE免疫染色からH₂はA549細胞において放射線による酸化ストレスを軽減し、Active caspase3とBaxのImmunoblot解析(図1E-G)、Bax translocation解析、PIとHoechstの2重蛍光発色解析から水素は放射線によるアポトーシスを介した細胞死を軽減した。これは放射線障害によるヒトMolt-4細胞のアポトーシスが抗酸化剤NACやTroloxによって軽減される報告と類似する(13)。以上の結果は、培養肺上皮細胞(in vitro)への放射線照射で生じる・OHなどの酸化ストレスによるアポトーシスに対してH₂治療に抑制効果があることを示している。

放射線肺障害は急性肺障害期とその後徐々に起こる慢性肺傷害期という時相の特徴がある。これには照射時に生じるROSとその後に持続して生じる局所のNADPH oxidase、xanthine oxidase、nitric oxide synthase (NOS)やmitochondrial respiratory chainの機能障害などから生じるROSが関連している。先のin vitroのデータで、放射線照射により生じる酸化ストレスを主因とするアポトーシス抑制作用がH₂治療で認められた。しかし、その抑制効果は不完全であった。そこでマウス肺放射線障害治療モデルでは、照射時に発生するROSに対するH₂吸入に加え、その後に持続して生じる局所ROSの抑制を目的にH₂

水飲水の治療を加えた。放射線照射後7日以内の急性肺障害期において、8-OHdGやTUNEL染色、MDA、BaxやTGF-β1の発現解析にて放射線照射で生じる肺内の酸化ストレスやアポトーシス所見はH₂治療で軽減された。これらは脳、心、肝臓の虚血再還流障害での急性酸化ストレス障害がH₂吸入によって抑制された報告と同様、主に照射時などに急激に発生する・OHなどによる傷害性の高いROSの除去効果に起因するものと考えられる。さらに後期には肺線維化の抑制がみられたが(図2, 3)、前期の抑制効果に加え、後期におけるROS(H₂O₂、O₂・、ONOO-など)の局所持続的発生に対するH₂水飲水による抗酸化効果が寄与していると考えられる。実際、持続的酸化ストレスが病因としてあげられるapolipoprotein EのKOマウス動脈硬化病変(14)やマウスでのシスプラチン腎障害病変(5)、移植ラット腎症病変(15)などがH₂水飲水で抑制されている。肺は呼吸代謝臓器であり、肺の血管豊富でルースな組織臓器的な構造はH₂が拡散するには有利である。マウスのH₂水飲水実験では飲水3分後に酸化ストレスを軽減する報告があるものの、H₂は短時間で低濃度になる(5)。この為、H₂水飲水の効果は・OHの消去以外のいくつかの機序が考えられる。肺や唾液腺では放射線照射で持続して生じる局所のONOO-発生の報告があるので、H₂水は後期に生じるONOO-を軽減した可能性がある(16)。さらにH₂水飲水ではSOD活性が増加する報告があり(17)、放射線肺障害として後期に生じる可能性ある局所のH₂O₂やO₂・の抑制に影響した可能性などが挙げられる。

Free radical scavengersによる放射線肺障害の抑制報告が数多くあるが、効果、毒性、耐性、選択性などから、臨床的に有効な理想的な放射線障害防御剤は見いだされていない(9)。H₂は生理的機能も担う酸化力が弱いO₂・やH₂O₂を還元せず、・OHやONOO-などの強い活性酸素種を選択的に還元するので生理機能に大きな影響を与えない事が想定され、実際、潜水病でヒトにも大きな問題はなく使用されている(18)。また現在までの動物実験で明らか問題となるような副作用は報告されていない。H₂治療は放射線による肺障害において副作用のない治療として極めて有望である。

2)ゲフィチニブ副作用について

上皮増殖因子受容体(EGFR)とそのリガンドは傷

害上皮の再生および種々の上皮系腫瘍増殖に重要な役割を果たしている。肺がん治療薬であるEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)ゲフィチニブはEGFR変異を伴う非小細胞肺癌に対して効果的だが、しばしば重篤な肺傷害を来し、びまん性肺胞傷害(DAD)や急性肺傷害(ALI)の病理像を呈する。年齢、喫煙歴、慢性間質性肺炎合併などが増悪させる危険因子として指摘されている(10)。

気道の障害と肺胞の障害、機能低下との関係の詳細はいまだ不明な部分が多いが、例えば細気管支上皮の傷害と修復の不全が肺胞の障害、機能低下をひき起こすと想定されている。肺局所の幹細胞、前駆細胞として細気管支に存在するクララ細胞、気道-肺胞境界部に存在するbronchio alveolar stem cellなどの傷害が考えられているが、幹細胞の異常が正常な修復を阻害し肺損傷をさらに誘導するとも考えられている(19)。

今回、ナフタレン単独およびナフタレン・ゲフィチニブ副作用モデルマウスで1週間内に体重低下やBALF中の細胞数の増加、肺組織のクララ細胞の減少、周囲炎症細胞浸潤がみられたが、これらは、このマウス気道障害モデルでの過去の報告と矛盾しなかった(11)。マウスへのゲフィチニブ単独投与だけでは大きな病変は観察されなかった。このようにナフタレン気道傷害マウスモデルにゲフィチニブを投与するモデルは、細気管支上皮の急性肺損傷の増悪を認めたが、このことは加齢、喫煙歴や慢性間質性肺炎の合併など細気管支を含めた上皮傷害を背景にもつ非小細胞肺癌患者にゲフィチニブによる急性肺損傷が発症しやすいことに通じるため、臨床的に非常に重要な障害モデルであると考えられた。

H₂水投与ではナフタレン単独でも体重低下やBALF中の細胞数の増加の抑制傾向があった(図4A)。ナフタレンによるクララ細胞の障害は酸化ストレスによる機序の報告があり、特にクララ細胞に特異的なCYP2F2の酸化反応によりナフタレンは選択的にエポキシ化され、このエポキシド(1R, 2S-naphthalene oxide)が自殺基質となりクララ細胞のアポトーシスを起こす事が報告されている(20)。クララ細胞はphospholipase A2など炎症性サイトカインの産生や線維芽細胞の遊走を抑制する効果があるクララ細胞分泌蛋白(Clara cell secretory protein : CCSP)(21)をはじめ、サーファクタント蛋白(surfactant

protein : SP-A, B, D)やプロテアーゼインヒビターであるsecretory leukoprotease inhibitor (SLPI)やelafinなどの分泌能を持っている(22)。また肺内で最も多種のcytochrome P-450 monooxygenase(CYP)活性を持ち(23)、末梢気道傷害時に気道上皮前駆細胞となると考えられており、代謝や傷害を含め末梢気道を中心とした肺の多彩な病態に重要な役割を果たすと考えられている(24)。グルタチオン剤など抗酸化剤によりナフタレン障害が抑制される報告もあり(25)、H₂水の今回の障害抑制効果はナフタレンによる酸化ストレス障害の抑制によるクララ細胞障害と付随する炎症の抑制の影響が考えられる。

ナフタレン単独よりナフタレン・ゲフィチニブ副作用モデルマウスはさらに障害が強い結果であったが、これは上皮増殖因子受容体(EGFR)とそのリガンドが傷害上皮の再生に重要な為、末梢気道傷害時に気道上皮の前駆細胞として重要なクララ細胞を中心とした上皮再生を抑制した影響が挙げられる。このナフタレンとゲフィチニブの併用による顕著な体重低下、BALF中細胞数の顕著な増加、さらには死亡率の上昇のいずれをも水素治療は有意に抑制した(図4A-C)。肺組織でもクララ細胞の減少、周囲炎症細胞浸潤が抑制されていた(図5, 6)。マウスへのゲフィチニブ単独投与で大きな病変は観察されなかった為、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤としてのゲフィチニブの作用効果を考慮するとナフタレンでのクララ細胞障害と付随する炎症の酸化ストレスに対するH₂水の抗酸化効果が、よりゲフィチニブによる再生障害でより顕著化した炎症、障害所見に対してさらに明確化した可能性があげられる。また近年ゲフィチニブによる培養肺上皮細胞でのHSP70発現抑制作用が報告されており(26)、これに伴って増大する酸化ストレスと炎症の増強にH₂が作用した可能性もある。

今後、酸化ストレスと炎症病態以外にもゲフィチニブの肺上皮におけるEGFRやHSP70に対する作用やその抗がん作用自身に対するH₂の影響などを解析し、臨床応用への可能性を更に検討する。

【結 論】

水素分子(H₂)治療により放射線肺障害やゲフィチニブ肺障害が抑制された。副作用のない治療薬とし

での臨床応用の可能性が示された。

参考文献

- 1) Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, *et al.* Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 2007;13(6):688-694.
- 2) Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361(3):670-674.
- 3) Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, *et al.* Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;373(1):30-35.
- 4) Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T, *et al.* Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(1):487-492.
- 5) Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, Ohta S. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64(4):753-761.
- 6) Vijayalaxmi, Reiter RJ, Tan DX, Herman TS, Thomas CR, Jr. Melatonin as a radioprotective agent: a review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59(3):639-653.
- 7) Fleckenstein K, Zgonjanin L, Chen L, *et al.* Temporal onset of hypoxia and oxidative stress after pulmonary irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68(1):196-204.
- 8) Vujaskovic Z, Anscher MS, Feng QF, *et al.* Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50(4):851-855.
- 9) Shirazi A, Ghobadi G, Ghazi-Khansari M. A radiobiological review on melatonin: a novel radioprotector. *J Radiat Res (Tokyo)* 2007;48(4):263-272.
- 10) Kudoh S, Kato H, Nishiwaki Y, *et al.* Interstitial lung disease in Japanese patients with lung cancer: a cohort and nested case-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(12):1348-1357.
- 11) Harada C, Kawaguchi T, Ogata-Suetsugu S, *et al.* EGFR tyrosine kinase inhibition worsens acute lung injury in mice with repairing airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(6):743-751.
- 12) Noda K, Tanaka Y, Shigemura N, *et al.* Hydrogen-supplemented drinking water protects cardiac allografts from inflammation-associated deterioration. *Transpl Int* 2012;25(12):1213-1222.
- 13) Ogura A, Oowada S, Kon Y, *et al.* Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells. *Cancer Lett* 2009;277(1):64-71.
- 14) Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377(4):1195-1198.
- 15) Cardinal JS, Zhan J, Wang Y, *et al.* Oral hydrogen water prevents chronic allograft nephropathy in rats. *Kidney Int* 2010;77(2):101-109.
- 16) Giaid A, Lehnert SM, Chehayeb B, Chehayeb D, Kaplan I, Shenouda G. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in mice with radiation-induced lung damage. *Am J Clin Oncol* 2003;26(4):e67-72.
- 17) Gu Y, Huang CS, Inoue T, *et al.* Drinking hydrogen water ameliorated cognitive impairment in senescence-accelerated mice. *J Clin Biochem Nutr* 2010;46(3):269-276.
- 18) Fontanari P, Badier M, Guillot C, *et al.* Changes in maximal performance of inspiratory and skeletal muscles during and after the 7.1-MPa Hydra 10 record human dive. *Eur J Appl Physiol* 2000;81(4):325-328.
- 19) Reynolds SD, Giangreco A, Hong KU, McGrath KE, Ortiz LA, Stripp BR. Airway injury in lung disease pathophysiology: selective depletion of airway stem and progenitor cell pools potentiates lung inflammation and alveolar dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287(6):L1256-1265.
- 20) Lesur O, Bernard A, Arsalane K, *et al.* Clara cell

- protein (CC-16) induces a phospholipase A2-mediated inhibition of fibroblast migration in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(1):290-297.
- 21) Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11(6):733-741.
- 22) Massaro GD, Singh G, Mason R, Plopper CG, Malkinson AM, Gail DB. Biology of the Clara cell. *Am J Physiol* 1994;266(1 Pt 1):L101-106.
- 23) Stripp BR, Maxson K, Mera R, Singh G. Plasticity of airway cell proliferation and gene expression after acute naphthalene injury. *Am J Physiol* 1995;269(6 Pt 1):L791-799.
- 24) Shultz MA, Choudary PV, Buckpitt AR. Role of murine cytochrome P-450 2F2 in metabolic activation of naphthalene and metabolism of other xenobiotics. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290(1):281-288.
- 25) Phimister AJ, Nagasawa HT, Buckpitt AR, Plopper CG. Prevention of naphthalene-induced pulmonary toxicity by glutathione prodrugs: roles for glutathione depletion in adduct formation and cell injury. *J Biochem Mol Toxicol* 2005;19(1):42-51.
- 26) Namba T, Tanaka K, Hoshino T, Azuma A, Mizushima T. Suppression of expression of heat shock protein 70 by gefitinib and its contribution to pulmonary fibrosis. *PLoS One* 2011;6(11):e27296.

特発性間質性肺炎の分子像の解析

石川 暢久 服部 登 河野 修興*

【背景・目的】特発性間質性肺炎(IIPs: idiopathic interstitial pneumonias)の中でも、特発性肺線維症(IPF: idiopathic pulmonary fibrosis)ならびに線維化が強い非特異性間質性肺炎(f-NSIP: fibrotic non-specific interstitial pneumonia)は極めて予後不良の疾患である。一方で、IPFとf-NSIPの臨床像、画像所見ならびに病理所見は類似しており、両者の鑑別は困難である。本研究の目的は外科的肺生検が施行されたIIP症例における分子像を網羅的に発現解析することである。

【方法】広島大学病院で外科的肺生検を施行し、IIPと診断した12症例(IPF 7症例, f-NSIP 5症例)の肺生検組織から抽出したmRNAをIllumina Human WG-6 v3 BeadChipsを用いてマイクロアレイ解析を行った。IIPsで発現上昇している遺伝子群の機能的分類をNIH DAVID and EASE onlineを用いて行った。

【結果】IPFとf-NSIPの発現プロファイルは非常に類似しており、明確に2群に分けることはできなかった。正常肺との比較ではIIPsで1594遺伝子が発現上昇していたが、MMP-1やKL-6/MUC1などの既存のIIPsのバイオマーカーが含まれていた。発現上昇している遺伝子群の機能的分類では、KEGG pathway上のCell cycle, ABC transporters, p53 signaling pathwayなどに関連する遺伝子が特徴的であり、IIPsの発現プロファイルは肺腺癌の発現プロファイルと類似していた。

【結論】IIPsの分子像の網羅的発現解析により、IIPsの分子学的病態を明らかにした。網羅的発現解析情報から、新規のバイオマーカーならびに治療標的の候補分子を多数同定した。

A. 研究目的

間質性肺炎とは、200種以上の疾患の総称であり、原因不明のものは特発性間質性肺炎(IIPs: idiopathic interstitial pneumonias)と呼ばれている。IIPsは臨床所見、画像所見と病理組織パターンによって、特発性肺線維症(IPF: idiopathic pulmonary fibrosis)や非特異性間質性肺炎(NSIP: non-specific interstitial pneumonia)を含めたいくつかの臨床病型に分類される。IPFは、IIPsの約半数を占める最も代表的な疾患であるが、線維化の強いNSIP(f-NSIP)とは臨床像、画像所見ならびに病理学所見は類似しており、両者の鑑別が困難なことも知られている。また、IIPsの中でも、IPFならびにf-NSIPは有効な治療法が限られている予後不良の疾患であり、特別に他のIIPsと区別して取り上げるべき重要な疾患である。

近年、ゲノム研究の進歩により、膨大な遺伝子発現情報を網羅的・体系的に把握することが可能になってきており、様々な疾患の病態に関する研究は飛躍的な進歩を遂げてきた。これにより、疾患に伴う分子病態の変化を網羅的かつ迅速に新規診断マーカー、治療標的分子をスクリーニングすることが可能になってきた。

本研究の目的は、外科的肺生検施行された症例におけるIIPsの分子像を解析することである。同時にIIPsの新規のバイオマーカーならびに治療標的の候補分子を同定することも目指したい。

B. 研究方法

広島大学病院において2002年から2011年までに外科的肺生検が施行され、IIPsと診断した12症例(IPF 7症例、f-NSIP 5症例)を対象とした。外科的肺生検組織から抽出したmRNAを用いてマイクロアレイによる網羅的発現解析を施行した。マイクロアレイ解析はIllumina Human WG-6 v3 BeadChipsを用いて行った。クラスター解析をM.EisenによるClusterおよびTreeViewのソフトを用いて行った(<http://rana.lbl.gov/eisen/>)。また、得られた発現情報より発現上昇遺伝子を抽出した。さらに、発現上昇遺伝子の機能的分類を、the NIH DAVID online tools (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究の対象者は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成13年3月29日文部省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に沿って作製され、当院のヒトゲノム研究倫理審査研究会で承認された文書によるインフォームド・コンセントが得られた症例とした。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。

C. 研究結果

1) IIPsの外科的肺生検組織を用いた網羅的発現解析

患者背景では、IPF症例ではf-NSIP症例と比較して男性、喫煙者が多い傾向を認めた(表1)。

Table 1 Clinical characteristics

Variables	IPF (n=7)	NSIP (n=5)
Age (years)	69.6±2.8	63.2±2.4
Gender (Male/Female) *	7/0	2/3
Smoking history (Smoker/non-smoker) *	7/0	2/3
Pack-years*	39.3±6.3	6.1±6.0
Pulmonary function test		
VC (%predicted)	94.1±8.5	70.2±7.9
DLco (%predicted)	62.3±11.5	52.4±5.5
FEV1.0/FVC (%)	83.5±2.7	83.4±4.5

Values are expressed as mean ± SEM or number.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (between two groups, Mann-Whitney U test or chi-square test).