

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**

日本医科大学大学院医学研究科 呼吸器内科学分野

* 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

【背景】

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は細胞外マトリックスの異常沈着を来とし、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は病理学的に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⁾。骨髄由来 fibrocyteは循環血液中から肺内へ遊走し、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、PFDの fibrocyteに対する抑制効果を検討した。

【方法】

C57BL/6 マウスにブレオマイシン (bleomycin: BLM)を投与し、PFDを14日間経口投与する予防モデルと、BLM投与後10日目から21日目までPFDを投与する治療モデルを作成した。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, CCL12とCXCL12の濃度を測定した。また、CCL2を免疫組織染色で評価し、CCL2に対するfibrocyteの遊走能を評価した。

【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。予防モデルにおいては、fibrocyteはBLM単独群では26.0%と上昇したが、PFD併用群で10.4%と減少を認めた(図1)。また、治療モデルにおいても、fibrocyteはBLM単独群では29.9%と上昇したが、PFD併用群で22.1%と減少を認めた(図2)。

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、BLM+PFD併用群では有意に fibrocyteが減少していた(図3,4)。

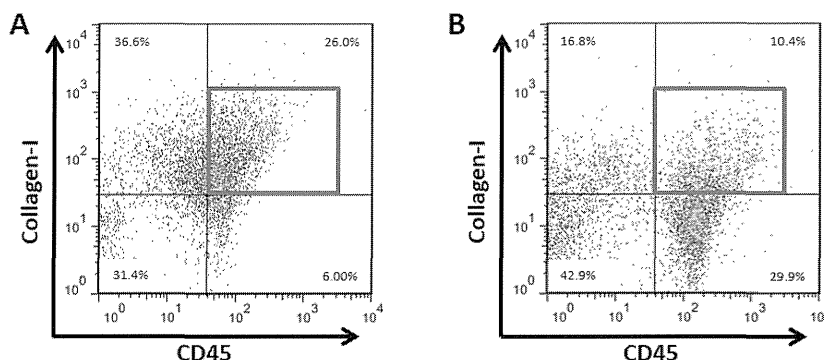


図1. 予防モデルにおける、CD45, collagen IによるFACS解析。
A:ブレオマイシン(BLM)単独群
B:BLM + pirfenidone(PFD)併用群

PFDによる chemokine 抑制効果

ELISAによるCCL2, CCL12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, CCL12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5,6). CXCL12濃度に関しては, PFD単独群と比較しBLM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

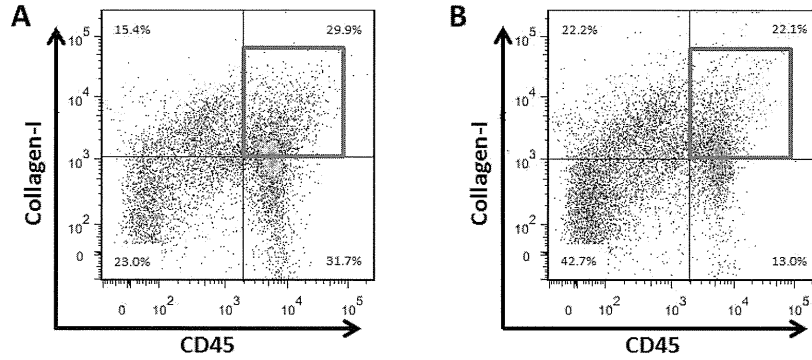


図2. 治療モデルにおける, CD45, collagen IによるFACS解析.
A:プレオマイシン(BLM)単独群
B:BLM + pirfenidone(PFD)併用群

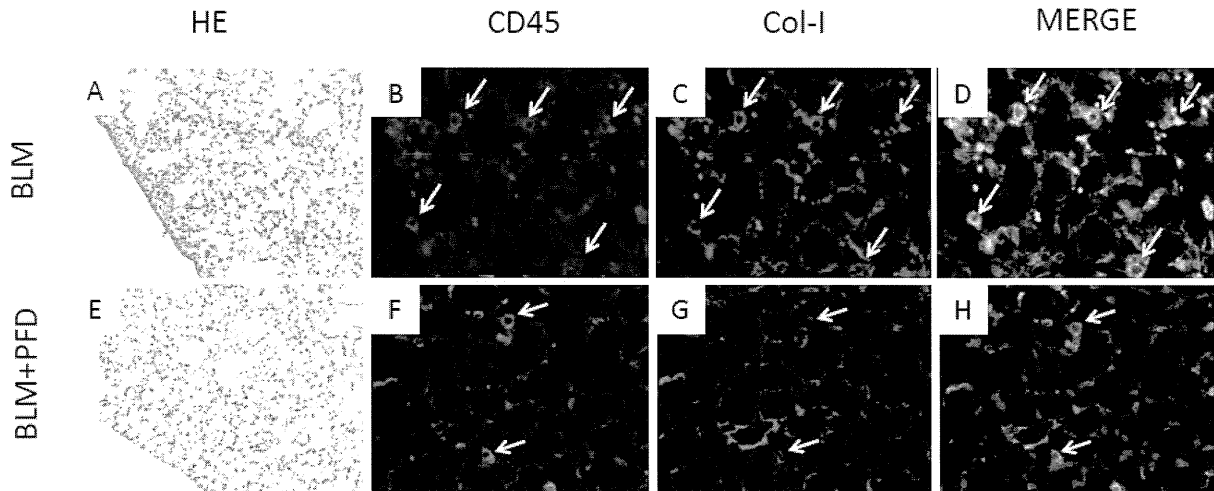


図3. CD45, collagen Iによる免疫組織染色

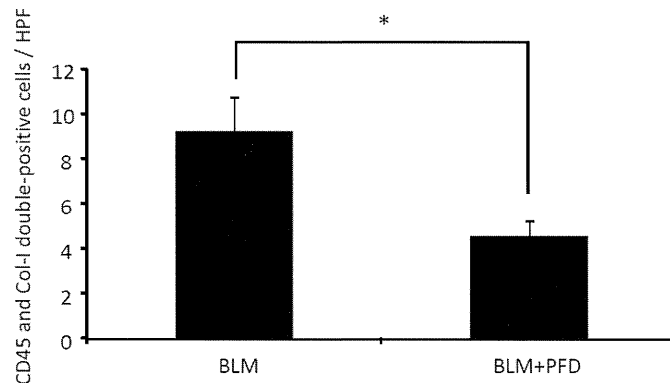


図4. CD45, collagen I陽性細胞 (fibrocyte) 数の比較

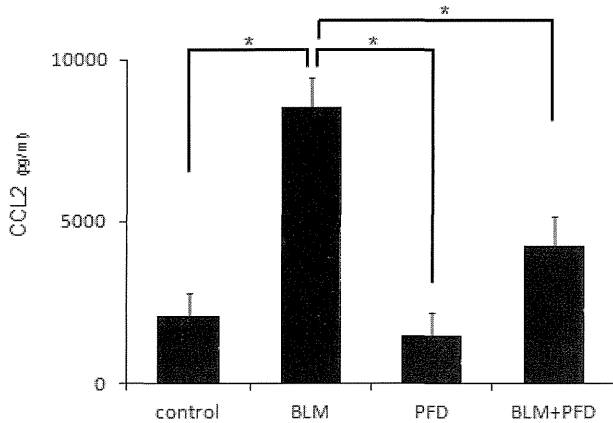


図5. CCL2濃度の比較

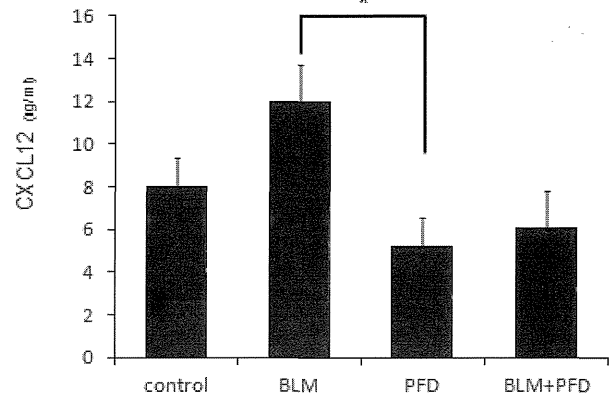


図7. CXCL12濃度の比較

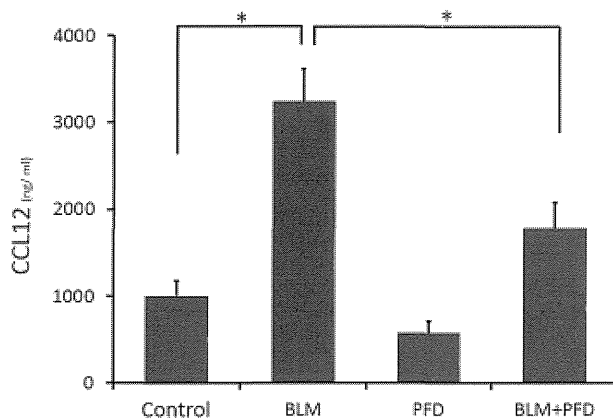


図6. CCL12濃度の比較

傾向は認められた(図7).

CCL2免疫組織染色

BLM単独群では、肺胞領域と細気管支領域において、特に肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ、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8).

CCL2に対するfibrocteの遊走能の抑制効果

CCL2 100ng/mlではfibrocteの遊走は見られなかったが、CCL2 200ng/ml, 500ng/mlによりfibrocteの遊走が認められ、PFD投与により有意に抑制された(図9).

【考 察】

PFDのfibrocte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fibrocteを減少させることを示した。また、PFDがCCL2, CCL12を抑制することが示されたため、CCL2, CCL12の抑制を介してfibrocte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。

Fibrocte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⁾。Fibrocteの末梢血中に占める割合は1%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fibrocteが減少していたことから、骨髄由来のfibrocte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。

Fibrocteの遊走に關与する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。さらにげっ歯類ではCCL12もfibrocteの遊走に重要な役割を果たしているが⁹⁾、PFDによるCCL12の抑制も確認された。

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, CCL12, fibrocte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事が期待される。

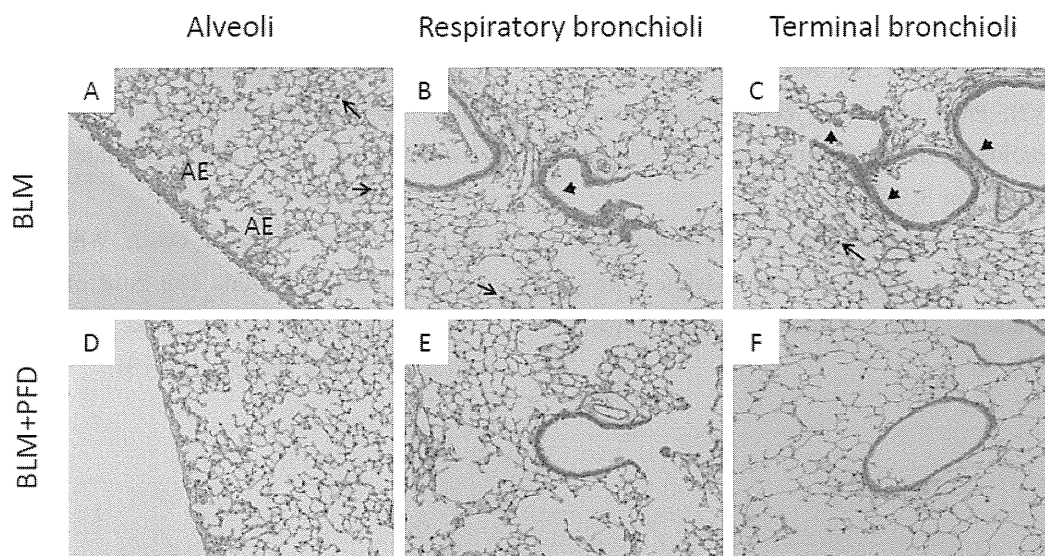


図8. CCL2の免疫組織染色

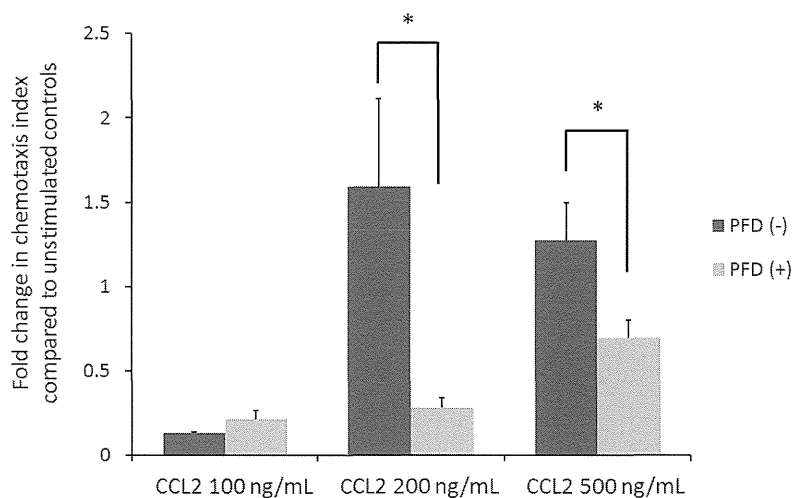


図9. CCL2に対する fibrocyte の遊走能

【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, Gaudie 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
- 9) Moore BB, Murray L, Das A, Wilke CA, Herrygers AB, Toews GB. 2006. The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 175-181.

一酸化窒素合成酵素完全欠損マウスを用いたブレオマイシン肺線維化モデルにおける一酸化窒素の役割の検討

野口 真吾¹ 矢寺 和博¹ 王 克鏞² 小田 桂士¹
赤田憲太郎¹ 山崎 啓¹ 川波 敏則¹ 石本 裕士¹
豊平由美子³ 柳原 延章³ 筒井 正人³ 迎 寛^{1*}

【背景・目的】

一酸化窒素 (NO) を含むフリーラジカルは肺線維化形成に重要な役割を担っていることが報告されており、実際、肺線維症患者では、iNOS/eNOS/nNOS の発現の亢進が認められている。しかし、NO synthases (NOS) 阻害剤の非特異性や各 NOS isoform の相補的關係のため、NO の肺線維化における役割は十分に解明できていない。そこで、今回、NO 合成酵素完全欠損マウスを用いて、肺線維化における NO の役割について検討を行った。

【方法】

7 週齢の Wild-type (WT; C57BL/6)、シングルノックアウト、および、NO 合成酵素完全欠損マウス(トリプルノックアウトマウス)を用いて検討を行った。各マウスにブレオマイシン 8mg/kg 10 日間の連日腹腔内投与を行い、最終投与日より 14 日後に肺重量、肺線維化(線維化スコア、コラーゲン量)の評価を行った。また、炎症性サイトカインについても評価を行った。

【結果】

トリプルノックアウトマウスでは、WT マウスに比べ、肺線維化スコア、コラーゲン量の有意な増加を認めた。また、IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA も有意に増加を認めた。いっぽうで、WT、シングルNOS ノックアウトマウスの間では肺の線維化に有意な差は認めなかった。

【結論】

NO 合成酵素完全欠損マウスでは、ブレオマイシン肺線維化モデルにおいて肺線維化の増悪を認めることを確認した。このことから、NO は、肺線維化形成において、保護的な役割を果たしている可能性が示唆された。

¹ 産業医科大学呼吸器内科学

² 生体情報研究センター

³ 薬理学

⁴ 琉球大学大学院医学研究科薬理学

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

A. 研究目的

一酸化窒素 (NO) は、ガス状のフリーラジカルであり、NO 合成酵素 (NOSs) を触媒として、L-arginine から L-citrulline に変換される過程で同時に生成される物質である (1)。NOSs には、neuronal NOS (nNOS)・endothelial NOS (eNOS)・inducible NOS (iNOS) の 3 種類の異なった isoform が存在し、肺では前二者 (nNOS・eNOS) は恒常的に発現しているが、iNOS は定常状態ではほとんど発現がみられず、各種炎症性サイトカイン・ケモカインなどの刺激によって気道や肺実質に発現することが報告されている (2)。

肺線維症は肺の慢性炎症と肺間質の進行性の線維化で特徴付けられる間質性肺疾患であるが、その病因における生化学的メカニズムについてはいまだ完全には理解されていない (3)。しかし、NO を含むフリーラジカルはその形成に重要な役割を担っており (4)、事実、肺線維症患者の肺においてはこれらの NOS isoform の発現がみられることが報告されている (5)。

肺線維化における NOS システムの役割については、多くの動物モデルで検討がなされており、iNOS は肺線維化の形成に関与すること (6)、eNOS は肺線維化の抑制に関与すること (7) が報告されているが、iNOS に関しては相反する報告も少なからず存在する (8)。このように、それぞれの isoform が異なった役割を呈していること、また、お互いの isoform が相補的な関係を示すことから (1, 9)、肺線維化における NO の本質的な役割については十分に理解できていないのが現状である。

筒井らは NO 自体の本質的な役割を明らかにするために、3 つの NO 合成酵素すべてを欠損させた NOS 完全欠損 (n/i/eNOS^{-/-}) マウスを完成させた (1, 9)。本研究では、この n/i/eNOS^{-/-} マウスを用いて、ブレオマイシン (BLM) の腹腔内投与を行うことによる肺線維症モデルを検討することにより、NO の肺線維化における役割について検討した。

B. 研究方法

マウスブレオマイシン肺線維症モデル

7 週齢 (雄) の Wild-type (WT) マウス、シングル

NOS ノックアウト (nNOS^{-/-} / iNOS^{-/-} / eNOS^{-/-}) マウス、トリプル n/i/eNOS^{-/-} マウスを使用した。これらのマウスに対して、BLM 8mg/kg を生食 200 μ l に溶解し、10 日間連続して腹腔内に投与し、最終 BLM 投与日より 14 日目に評価を行った。また、生食 200 μ l を投与する対照群にも同様の評価を行った。

組織学的評価

BLM の最終投与日より 14 日目に両肺を摘出し、左肺は、hematoxylin-eosin (HE) 染色および Masson trichrome 染色にて評価を行った。線維化の範囲に関しては、BIOREVO (BZ-9000, Keyence, Japan) を用い、Masson trichrome 染色陽性部位 / スライスを面積として算出して解析した。また、右肺は重量測定後、コラーゲン量の測定 (Sircol Collagen Assay kit; Biocolor Ltd, UK) に使用した。

気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞および蛋白濃度の評価

肺の炎症性変化の評価として、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 中の細胞数、および、蛋白濃度 (BIO-RAD Protein Assay Kit; 500-0002JA, Hercules, CA) を測定した。

サイトカイン、増殖因子の評価

炎症性サイトカイン・増殖因子の評価として、real time polymerase chain reaction (PCR) を用い、摘出された肺組織中の interleukin (IL)-1 β ・IL-6・tumor necrosis factor (TNF)- α ・interferon (IFN) - γ ・tissue growth factor (TGF)- β 1 の発現量の測定を行い、WT マウスと n/i/eNOS^{-/-} マウスとの比較を行った。また、BALF 検体を用いて酵素結合免疫吸着法 (ELISA) により TGF- β 1 の蛋白量評価を行った。なお、本研究は産業医科大学倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

肺の組織学的変化

対照群では、いずれの NOS ノックアウトマウスにおいても、明らかな病理学的変化を認めなかった。BLM 投与 14 日目の評価では、n/i/eNOS^{-/-} マウスで有意な肺重量の増加を認めた (図 1)。HE 染色・Masson trichrome 染色にて、いずれの NOS ノックアウトマ

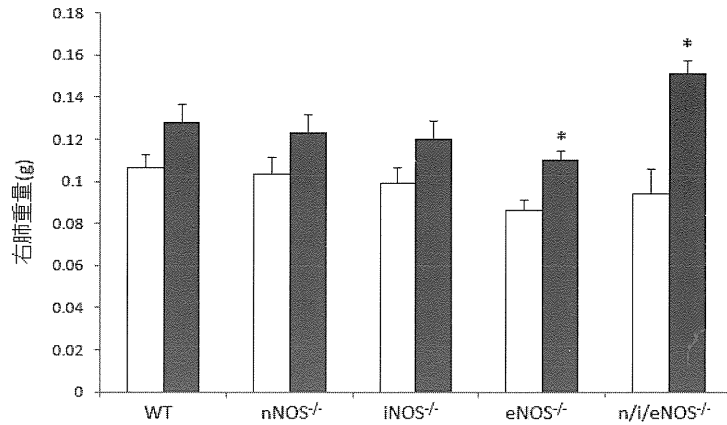


図1. 右肺重量の変化
 左) コントロール群(n=3)
 右) プレオマイシン投与群(n=5-7)
 * P < 0.05 (vs. WTマウスBLM投与)

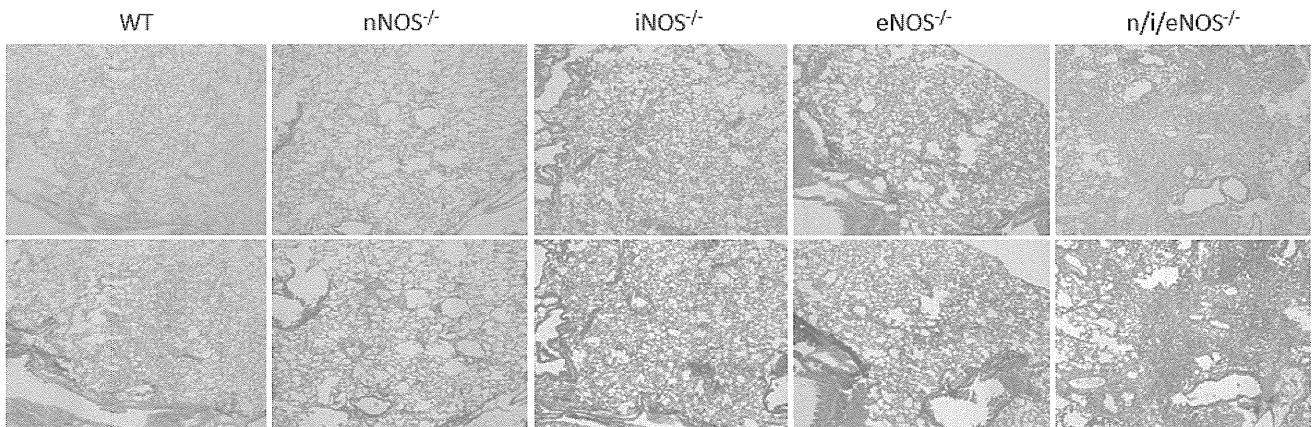


図2. 肺組織所見
 上段) Hematoxylin-eosin (HE)染色
 下段) Masson trichrome染色

ウスにおいても、肺炎症・線維化の所見を認めた。炎症・線維化の程度は、n/i/eNOS^{-/-}マウスにおいて最も強く認められた(図2)。また、画像定量的評価を行い、Masson trichrome染色における線維化の面積の評価、および、collagen assay kitを用いたコラーゲン量は、いずれもn/i/eNOS^{-/-}マウスにおいて増加していた(図3A, B)。一方で、WTマウスと、各シングルNOSノックアウトマウスの間には明らかな有意差を認めなかった。

肺の炎症性変化の評価

BALF 所見では、n/i/eNOS^{-/-}マウスではその他のマウスと比較して総細胞数の有意な増加を認めた(図4A)。また、BALF中の細胞分画ではマクロファ-

ジの数に有意な変化を認めなかったが、リンパ球の数に関しては、n/i/eNOS^{-/-}マウスで有意に増加を認めた(図4B, C)。また、同様に蛋白濃度もn/i/eNOS^{-/-}マウスで有意な増加を示した(図4D)。一方、WTマウスと各シングルNOSノックアウトマウスの比較では、総細胞数、マクロファージ数に有意な差は認めなかったが、iNOS^{-/-}マウスにおいて、リンパ球数の有意な減少に加えて、nNOS^{-/-}およびiNOS^{-/-}マウスにおいて蛋白濃度の有意な低下を認めた。

炎症性サイトカインの評価

炎症性サイトカインとして知られるIL-1β・IL-6・TNF-αの肺におけるmRNAレベルの評価を行い、WTマウスと比較して、n/i/eNOS^{-/-}ではいずれも発

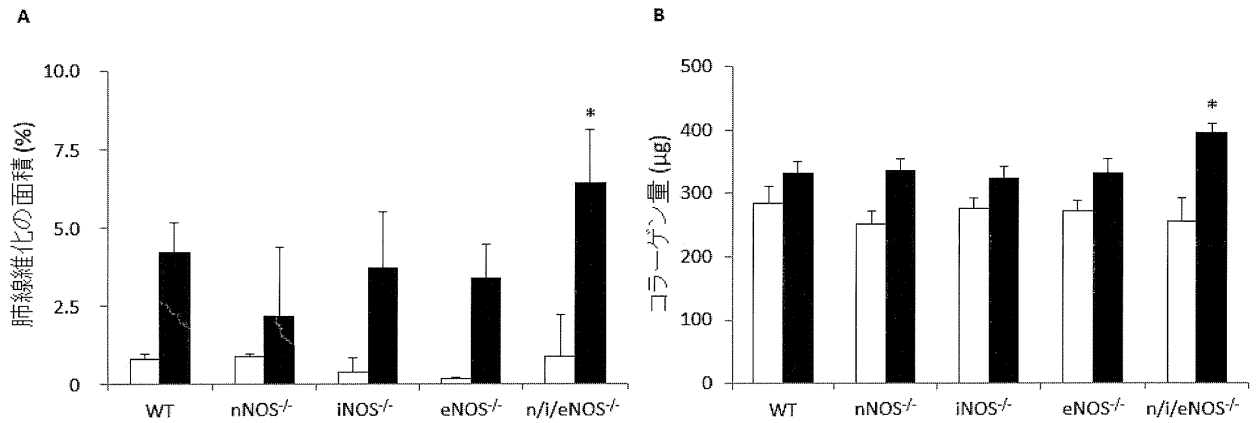


図3. 肺線維化の評価

A) Masson trichrome 染色を用いた肺線維化の面積

B) コラーゲン量

左) コントロール群 (n=3)

右) プレオマイシン投与群 (n=5)

* P < 0.05 (vs. WT マウス BLM 投与)

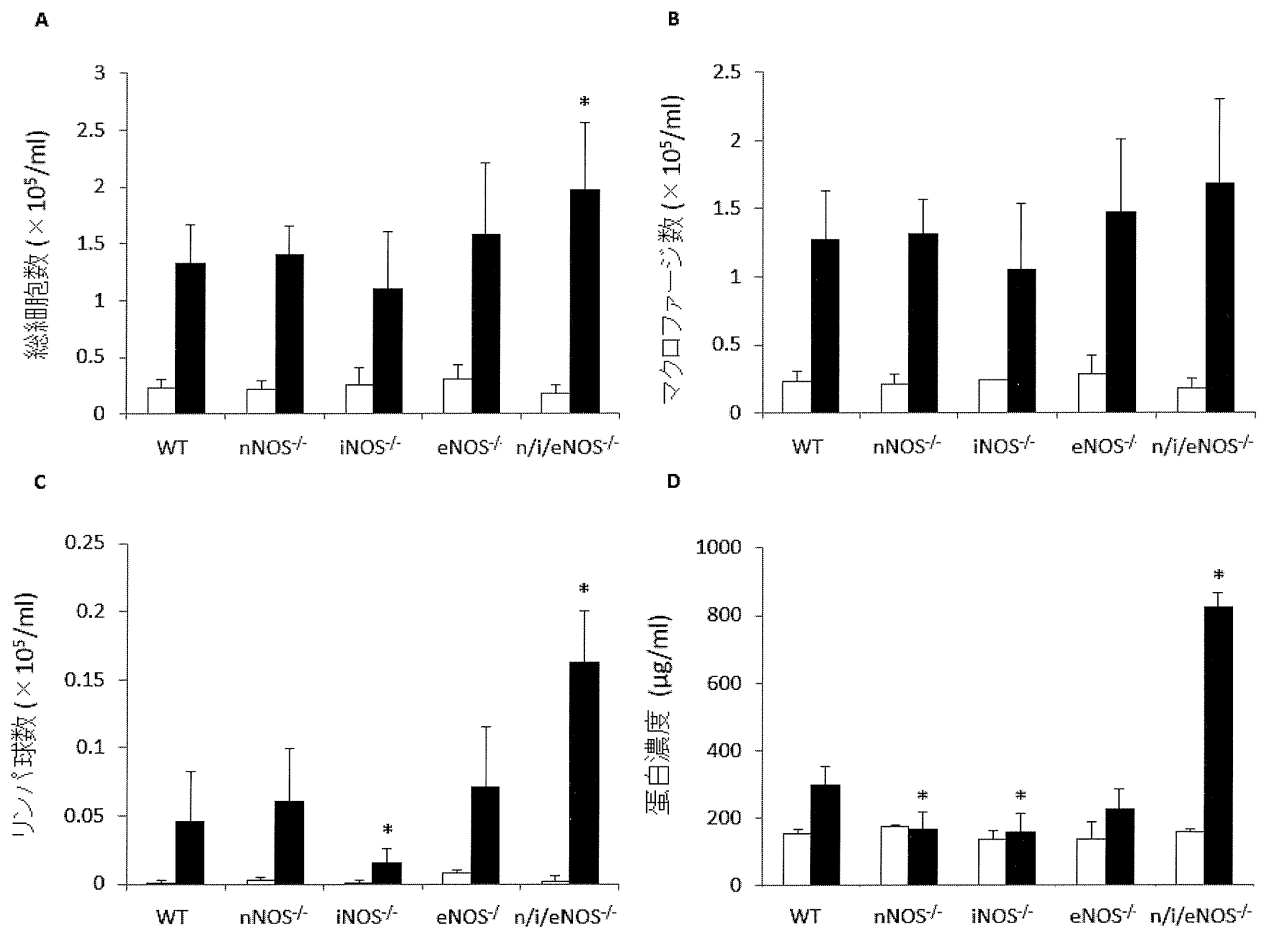


図4. BAL中の総細胞数・各細胞分画の評価

A) 総細胞数

B) マクロファージ数

C) リンパ球数

D) 蛋白濃度

左) コントロール群 (n=3)

右) プレオマイシン投与群 (n=5)

* P < 0.05 (vs. WT マウス BLM 投与)

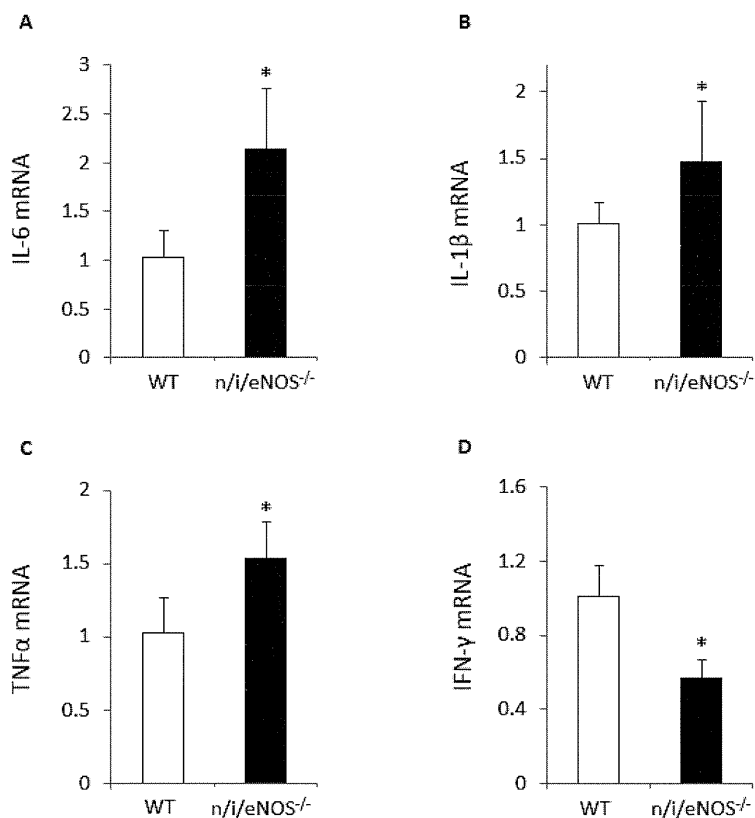


図5. BAL中炎症性サイトカインの発現(n=5)

A) IL-6

B) IL-1β

C) TNF-α

D) IFN-γ

* P < 0.05 (vs. WTマウス BLM投与)

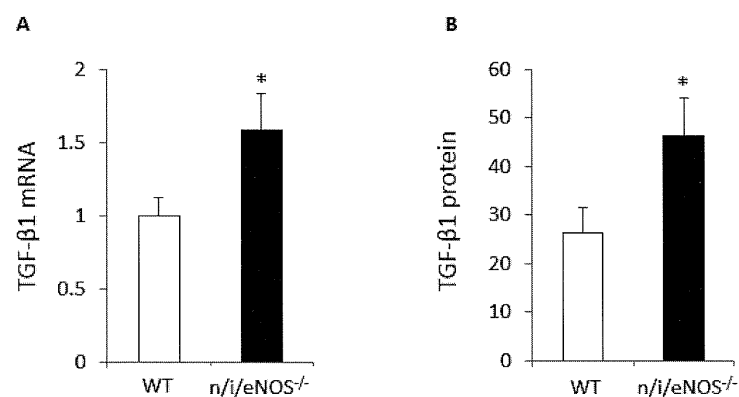


図6. 肺内TGF-β1の発現(n=5)

A) 肺組織

B) BALF

* P < 0.05 (vs. WTマウス BLM投与群)

現量の有意な増加を認めた(図5A, B, C). 一方で, IFN-γについては, WTマウスと比較して, n/i/eNOS^{-/-}で発現量の有意な減少を認めた(図5D).

TGF-β1の評価

肺内におけるTGF-β1の発現については, mRNAレベル, 蛋白量ともに, WTマウスと比較して, n/i/eNOS^{-/-}で有意な増加を認めた(図6).

D. 考 察

本研究では、n/i/eNOS^{-/-}マウスを用いて、NOの肺線維化における本質的な役割についての検討を行った。

組織の線維化におけるNOの役割については、NG-nitro-L-arginine methyle ester (L-NAME)を中心とした非特異的NOS阻害剤を用いた様々な研究が行われてきたが、NOの線維化における本質的な作用については十分に解明されていない。このようにNOの十分な役割が明らかにならない理由の一つとして、これまでの研究で使用されてきたL-NAMEなどのNOS阻害剤の非特異性(10)や、各NOS isoform間の相互補填作用(1, 9)が研究結果に大きく影響を与えている可能性が指摘されている。特に肺線維症とNOの関係に関しては、同じ呼吸器疾患である気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患(COPD)と比較しても、NOSの発現や機能については知見が少ないのが現状である。肺線維化とNOの関係については各種選択的阻害剤を用いた報告が多くなされているが、これまでの報告では、eNOSに関しては肺の線維化には保護的な作用を有するという報告(7)で一致しているものの、iNOSについては肺線維化を増悪させる報告(6)が多い半面、肺線維化を抑性させるとする報告(8)も少なからず散見される。また、nNOSの肺線維化に対する役割に関しては不明な点が多いが、ブレオマイシン吸入肺線維症モデルにおいてnNOSは経時的に変化を認めず、関与しなかったとする報告もみられる(11)。このように、各NOS isoformがそれぞれ異なった働きをすることや、シングルやダブルNOSノックアウトマウスにおいて残ったNOS isoformが相補的に機能することがNO自体の本質的な役割の解明をより一層困難にしている。

我々は今回、NOの本質的な役割を理解するために、すべてのNOSをノックアウトしたn/i/eNOS^{-/-}マウスを用いて、WTマウスと比較してn/i/eNOS^{-/-}マウスではブレオマイシン投与による肺線維化が増悪することを示した。このことから、ブレオマイシン肺線維化モデルにおいて、NOは重要な保護因子であることが示唆された。

また、肺線維化を含む様々な線維増殖性疾患の重要な因子の一つであるTGF-β1についても、今回の

結果では、WTマウスと比較してn/i/eNOS^{-/-}マウスではTGF-β1発現量の増加を認めており、TGF-β1は肺線維化に重要な役割を果たしていることが考えられた。

肺内の炎症性サイトカインについてもmRNAレベルの評価を行ったが、肺線維症において増加することが知られているIL-6, IL-1β, TNF-αや、抗線維化作用が知られており肺線維症では低下することが知られているIFN-γについては(12)、今回のわれわれが検討で得た結果は、これまでのブレオマイシンを中心とした肺線維化モデルの結果と同様であった。

今回の検討において、WTマウスと各シングルNOSノックアウトマウスの間において、有意な差を得ることはできなかった。この理由としては他のNOS isoformの相互作用が影響をしている可能性が考えられる。事実、森下らはシングルNOSノックアウトマウスやダブルNOSノックアウトマウスにおいては、NOxの産生が補充されていることを示している(9)。

今回、我々はNOSシステムの完全欠損によるNOの欠損は、ブレオマイシン肺線維化モデルにおいて、肺の炎症や肺線維化の著しい悪化を示すことを示した。このことから、肺線維化においてNOが重要な保護的役割を示していると考えられる。

References

- 1) Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, Nakashima Y, Yanagihara N. Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J Pharmacol Sci* 2006; 102: 147-154.
- 2) Sugiura H, Ichinose M. Nitritative stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide* 2011; 25: 138-144.
- 3) Janssen W, Pullamsetti SS, Cooke J, Weissmann N, Guenther A, Schermuly RT. The role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) in pulmonary fibrosis. *J Pathol* 2013; 229: 242-249.
- 4) Kinnula VL, Fattman CL, Tan RJ, Oury TD. Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 417-422.

- 5) Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1763-1769.
- 6) Hsu YC, Wang LF, Chien YW. Nitric oxide in the pathogenesis of diffuse pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 599-607.
- 7) Yoshimura S, Nishimura Y, Nishiuma T, Yamashita T, Kobayashi K, Yokoyama M. Overexpression of nitric oxide synthase by the endothelium attenuates bleomycin-induced lung fibrosis and impairs MMP-9/TIMP-1 balance. *Respirology* 2006; 11: 546-556.
- 8) Davis DW, Weidner DA, Holian A, McConkey DJ. Nitric oxide-dependent activation of p53 suppresses bleomycin-induced apoptosis in the lung. *J Exp Med* 2000; 192: 857-869.
- 9) Morishita T, Tsutsui M, Shimokawa H, Sabanai K, Tasaki H, Suda O, Nakata S, Tanimoto A, Wang KY, Ueta Y, Sasaguri Y, Nakashima Y, Yanagihara N. Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 10616-10621.
- 10) Kilbourn RG, Szabó C, Traber DL. Beneficial versus detrimental effects of nitric oxide synthase inhibitors in circulatory shock: lessons learned from experimental and clinical studies. *Shock* 1997; 7: 235-246.
- 11) Jang AS, Lee JU, Choi IS, Park KO, Lee JH, Park SW, Park CS. Expression of nitric oxide synthase, aquaporin 1 and aquaporin 5 in rat after bleomycin inhalation. *Intensive Care Med* 2004; 30: 489-495.
- 12) Oku H, Shimizu T, Kawabata T, Nagira M, Hikita I, Ueyama A, Matsushima S, Torii M, Arimura A. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol* 2008; 590: 400-408.

ブレオマイシン肺線維症モデルにおける focal adhesion kinase 阻害薬の抗線維化効果

西岡 安彦* 木下 勝弘 後東 久嗣

【背景】 Focal adhesion kinase (FAK) は、細胞内シグナル伝達にかかわる 125kDa の非レセプター型チロシンキナーゼで、細胞の遊走、増殖、生存に重要な役割を果たしていることが知られている。これまでの報告では、TGF- β による肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化にインテグリン-FAK 経路が関与しており、特に FAK の Y397 のリン酸化が重要であることが示されている。そこで今回我々は FAK 阻害薬 TAE226 を用いて抗線維化効果について検討した。【方法】 TAE226 はノバルティス社から供与を受けた。肺線維芽細胞株として、C57BL/6 マウス肺から樹立した線維芽細胞株を使用した。細胞増殖は³H-チミジン取り込み試験を用いて、細胞分化については α -smooth muscle actin と collagen I 発現についてウェスタンブロット法にて検討した。肺線維症モデルは、C57BL/6 マウスに浸透圧ポンプを用いてブレオマイシン (bleomycin: BLM) を持続皮下投与することで作製した。炎症細胞の評価を気管支肺胞洗浄による細胞成分の解析で、肺線維化の評価をヘマトキシリン・エオジン染色による線維化スコア (Ashcroft score) と collagen 含量の定量にて評価した。【結果】 TAE226 は、肺線維芽細胞の増殖を抑制するとともに、コラーゲン産生および筋線維芽細胞への分化を抑制した。BLM 肺線維症モデルにおいて、TAE226 は肺間質の増殖細胞数を減少させ、肺線維化を抑制した。【考察】 FAK 阻害薬の抗線維化薬として可能性が示唆された。

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
呼吸器・膠原病内科学分野

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

はじめに

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) の本態は、繰り返す肺胞上皮の傷害と異常な組織の修復と考えられており、組織学的には肺線維芽細胞及び筋線維芽細胞の異常集積と細胞外マトリックスの沈着に特徴づけられ、その過程で多くの増殖因子などの分子が関わりと考えられているが、未だ具体的な分子を標的とした治療法の確立には至っていないのが現状である。

我々のグループは肺線維症の分子標的治療確立をテーマとしてこれまで platelet-derived growth factor (PDGF) や CCN (CYR61, CTGF, NOV) ファミリーなどに注目し、治療標的としての可能性を検討してきた。

CCN (CYR61, CTGF, NOV) ファミリーは 1990 年代に発見されたシステインを豊富に含むタンパク質群で、細胞の分裂、接着、アポトーシスなどに深く関与することがこれまで知られており²⁾、マウスのブレオマイシン肺線維症モデルにおいて CCN2/CTGF の mRNA が発現しているという報告³⁾や CCN4 の発現がマウスブレオマイシン誘発肺線維症モデルや IPF 患者肺で亢進しているという報告⁴⁾などから肺線維化との関連が示されてきた。また CCN ファミリーによるシグナル伝達がインテグリンを介して行われることも報告されている⁵⁾。我々のグループで各種 CCN ファミリーの肺線維芽細胞におけるシグナル伝達経路について検討したところ、CCN6 刺激により $\beta 1$ インテグリンを介して focal adhesion kinase (FAK) の Y397 のリン酸化が生じ、肺線維芽細胞の増殖が誘導されることが確認された⁶⁾。

FAK は、細胞内シグナル伝達にかかわる 125kDa の非レセプター型チロシンキナーゼで、細胞の遊走、増殖、生存に重要な役割を果たしていることが知られている。これまでの報告では、TGF- β による肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化にインテグリン-FAK 経路が関与しており、特に FAK の Y397 のリン酸化が重要であることが示されている⁷⁾。

そこで今回我々は FAK シグナルに焦点を当て、臨床開発が行われている FAK 阻害剤 (TAE226) を用いて肺線維芽細胞の増殖・分化に及ぼす影響とブレオマイシン (bleomycin: BLM) 誘発マウス肺線維症モデルを用いた動物実験にて検討した⁷⁾。

1 実験方法

in vitro の実験には C57BL/6 マウス肺から樹立した肺線維芽細胞株を用いた。増殖能の測定は、³H-チミジン取り込み試験を用いた。FAK 阻害剤として、Novartis Pharma 社より供与された TAE226 を使用した。TGF- β 刺激で誘導された α -smooth muscle actin (SMA) の発現をウェスタンブロット法で評価することにより TAE226 が肺線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化に与える影響を検討した。また TAE226 が肺線維芽細胞による collagen I 産生に及ぼす効果についてもウェスタンブロット法で評価した。

TAE226 による *in vivo* の抗線維化効果は BLM 肺線維症マウスモデルを用いて検討した。実験 1 日目に BLM (125mg/kg) を充填した浸透圧ポンプを 6～8 週齢の C57BL/6 マウス皮下に留置し、1 週間持続皮下投与することで肺線維症モデルを作成し、15 日目～28 日目に TAE226 を連日経口投与した。29 日目に気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL) を施行し、その細胞分画を検討した後、sacrifice したマウス肺のヘマトキシリン・エオジン染色を用いて肺の線維化を Ashcroft Score にて評価し、マッソン・トリクローム染色でも線維化を検討した。また対側肺については Sircol collagen assay kit を用いて collagen の定量を行った。

2 結果

1) 肺線維芽細胞の増殖・筋線維芽細胞への分化・細胞外マトリックス産生に TAE226 が及ぼす影響の検討

PDGF (10ng/ml) 及び insulin-like growth factor (IGF)-I (50 ng/ml) による増殖刺激因子存在下で C57BL/6 マウス肺線維芽細胞を 72 時間培養し、それぞれ TAE226 を添加することで増殖に与える影響を検討した。TAE226 は PDGF 及び IGF-I によって促進された肺線維芽細胞の増殖を濃度依存的に抑制した (図 1A, B)。また、C57BL/6 マウス肺線維芽細胞を TGF- β (5ng/ml) 存在下で培養し、TGF- β によって促進された α -SMA の発現に対して TAE226 が与える影響を検討した。TAE226 は TGF- β 刺激により促進された α -SMA の発現を濃度依存的に抑制した。また collagen I の発現についても濃度依存的な抑制効果を示した

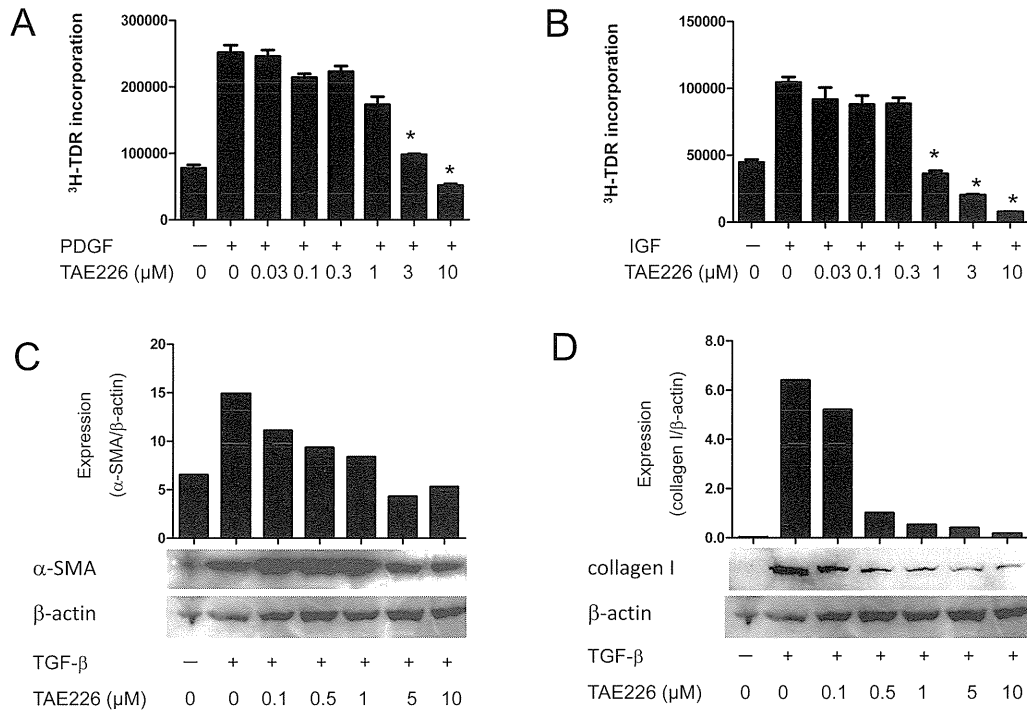


図1 TAE226による肺線維芽細胞増殖抑制効果及びα-SMA・collagen I発現抑制効果
 C57BL/6マウス肺より樹立した線維芽細胞株をPDGF 10ng/ml(A)及びIGF-I(50ng/ml)(B)で刺激し、TAE226を加えた後48時間後に³H-チミジン取り込み試験を用いて肺線維芽細胞の増殖を評価した。IGF刺激下においてTAE226による増殖抑制効果はTAE226 1μMから認められた。またC57BL/6線維芽細胞をTGF-β 5ng/mlで刺激し、TAE226を加えた後24時間後にウェスタンブロット法を用いてα-SMA(C)及びcollagen I(D)の発現を評価した。TAE226により濃度依存的にα-SMA及びcollagen Iの発現が抑制されることを確認した。*P<0.05 (文献8より引用改変)

表1 BLM肺線維症モデルマウスのBAL細胞分画にTAE226が及ぼす影響

BLM肺線維症モデルマウスに対して15日目～28日目にTAE226を連日経口投与し29日目にBALを行いその細胞数・細胞分画を評価した。BLM投与により炎症細胞の絶対数及びリンパ球の比率が増加、TAE226を投与することによりリンパ球比率が低下した。*P<0.01 (文献8より引用)

	Total cells (x10 ⁶)	Cell differentiation (%)		
		Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils
Control	0.10 ± 0.04	86.0 ± 3.46	8.5 ± 3.87	0.25 ± 0.5
TAE226 30mg/kg	0.12 ± 0.04	95.3 ± 1.98	4.60 ± 1.73	1.00 ± 0.81
BLM	9.20 ± 0.63	56.5 ± 11.38	41.8 ± 10.85	2.17 ± 1.26
BLM + TAE226 15mg/kg	8.85 ± 1.98	77.8 ± 4.83	21.2 ± 4.14*	0.75 ± 1.04
BLM + TAE226 30mg/kg	9.40 ± 1.99	78.0 ± 9.18	20.1 ± 9.34*	1.82 ± 1.22

(図1C, D). 同様のTAE226の作用は、ヒト肺線維芽細胞株MRC-5に対しても確認された(データ未掲載).

2) BLM肺線維症モデルマウスのBAL細胞分画にTAE226が及ぼす影響の検討
 BLM投与後29日目にそれぞれの群においてBAL

を行いその細胞数・細胞分画を評価した。BLM投与によりマクロファージやリンパ球の絶対数が増加しリンパ球の比率が増加しており、TAE226を投与することによりリンパ球比率が低下することを確認した(表1)。また同じBLM誘発肺線維症モデルで1日目よりTAE226を投与し7日目にBALを行ったところ、TAE226投与により総細胞数や細胞分画には

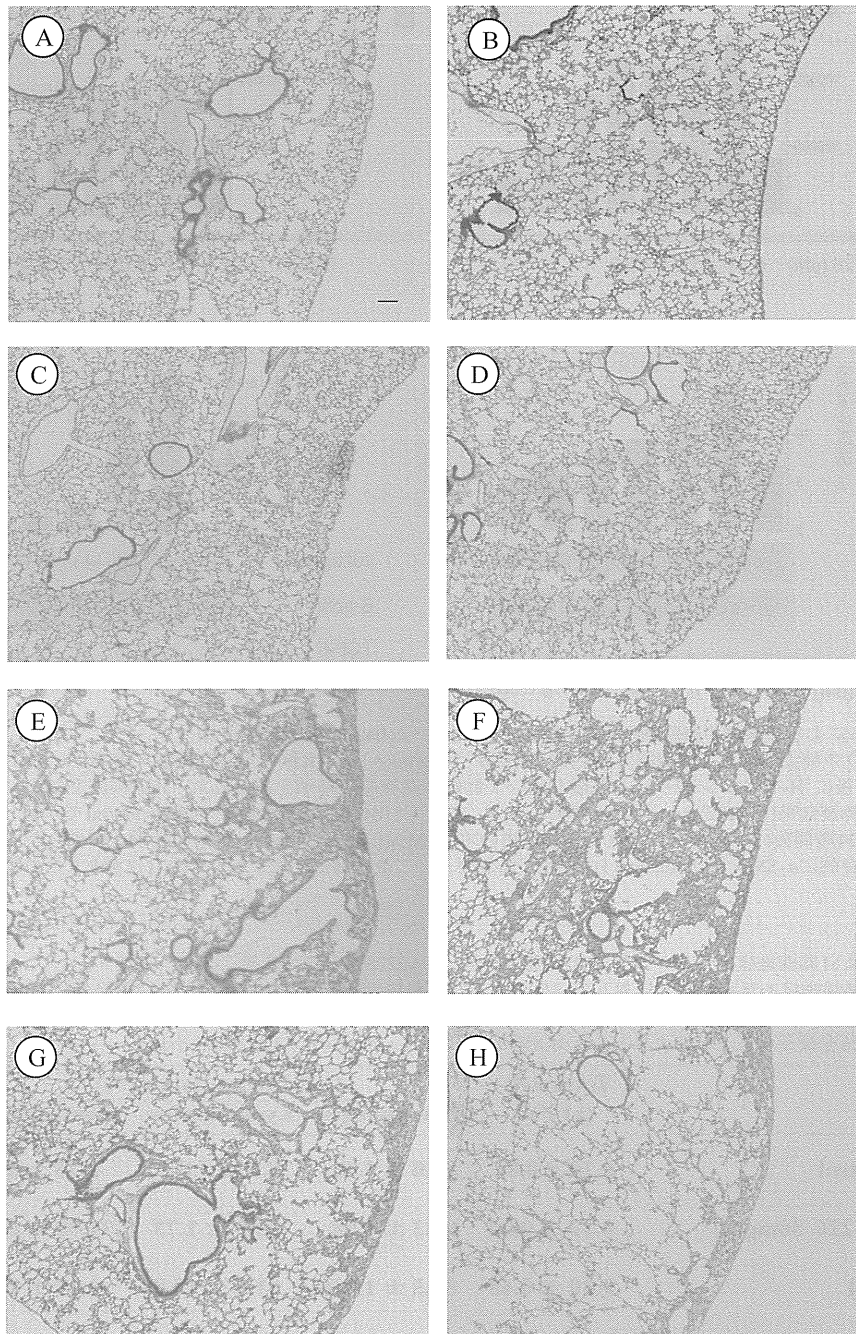


図2 BLM肺線維症モデルにおけるTAE226の肺線維化抑制効果
 BLM肺線維症モデルマウスに対して15日目～28日目にTAE226(30mg/kg/日)を連日経口投与し、29日目に肺を摘出した後ヘマトキシリン・エオジン染色(A,C,E,G)及びマッソン・トリクローム染色(B,D,F,H)を用いて肺線維化を評価した。TAE226の投与により組織学的に肺線維化の抑制が確認された。A,B: saline, C,D:TAE226, E,F:BLM+saline, G,H:BLM+TAE226, (文献8より引用)

変化を認めず(データ未掲載), TAE226の効果は早期の炎症相よりはむしろ線維化相において現れていると考えられた。

3) BLM肺線維症モデルマウスにおけるTAE226の肺線維化抑制効果

BLM投与開始後、29日目の肺組織におけるヘマ

トキシリン・エオジン染色によるAshcroft scoreでの定量及びマッソン・トリクローム染色の検討から、TAE226 30mg/kg/日の投与によりBLMにより惹起された肺の線維化が有意に抑制されていることが組織学的に確認された(図2・図3A)。また肺組織中のcollagen定量においてもTAE226が有意にcollagen産生を抑制することが示された(図3B)。また、Ki67

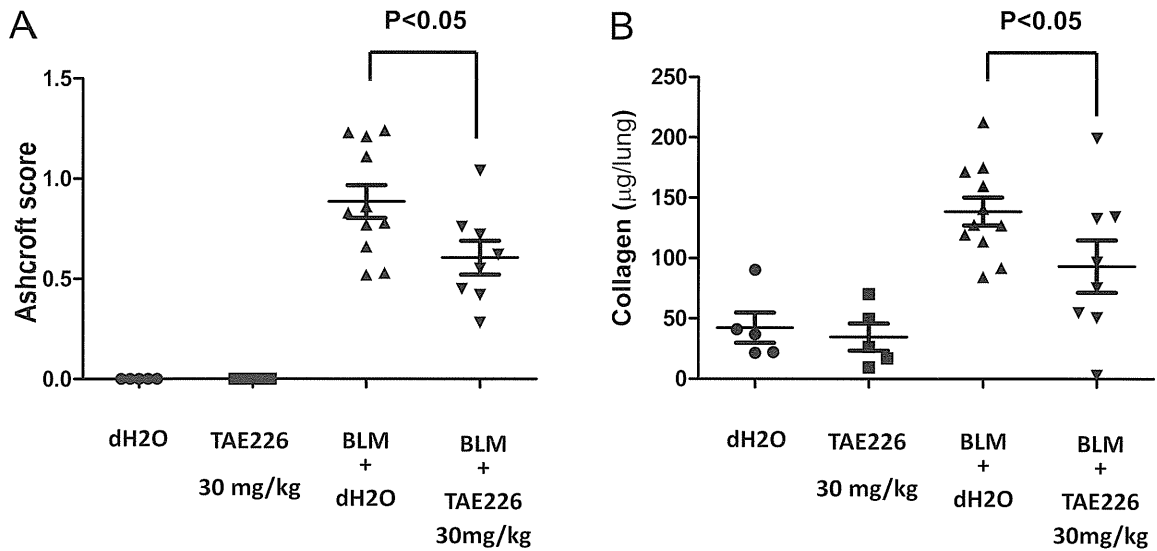


図3 BLM肺線維症モデルにおけるTAE226の肺線維化抑制効果の定量的評価
29日目に摘出した肺のヘマトキシリン・エオジン染色施行標本を病理医の評価に基づいてAshcroft Scoreによる数値化を行った(図3A)。TAE226の投与により有意に肺の線維化が抑制された。また対側肺のSircol collagen assay kitを用いたcollagen定量を施行し、TAE226がcollagen産生も抑制することが示された(図3B)。(文献8より引用)

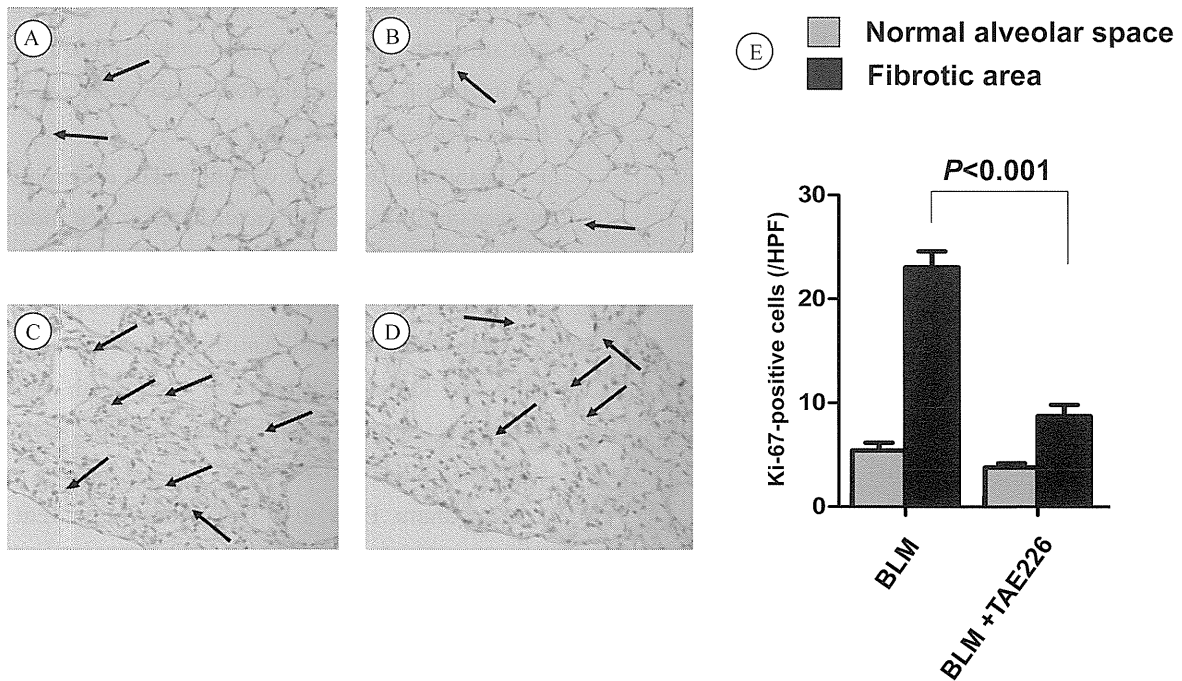


図4 BLM肺線維症モデルにおけるTAE226の肺線維芽細胞増殖抑制効果
BLM肺線維症モデルマウスに対して15日目～day28日目にTAE226(30mg/kg/日)を連日経口投与し、29日目に肺を摘出した後、Ki67の免疫染色を行い陽性細胞数を検討した。TAE226の投与によりKi67陽性細胞は有意に減少していることが確認された。A: saline, B:TAE226, C:BLM+saline, D:BLM+TAE226, 矢印はKi67陽性細胞。(文献8より引用)

免疫染色により線維化巣における増殖細胞数を検討したところ、TAE226投与群で間質のKi67陽性細胞数が有意に減少していた(図4)。上記肺組織においてprolyl-4-hydroxylaseとp-FAK-Tyr397の二重染色を行ったところ、prolyl-4-hydroxylaseを発現している

間質の線維芽細胞と思われる細胞にFAKの活性化が確認され、TAE226投与でFAK-Tyr397のリン酸化が抑制されていることが確認された(データ未掲載)。同様の所見が線維化領域のII型肺胞上皮と思われる細胞にも確認され、肺胞上皮細胞から肺線維

芽細胞への分化が生じている可能性が示唆された。

おわりに

今回の検討から FAK 阻害剤が肺線維芽細胞の増殖を抑制し、さらには線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を阻害することにより肺線維症の進展抑制効果を発揮することが確認された。本実験では FAK 阻害剤は後半の2週間のみ投与されており、TAE226 の早期投与では BAL 液での細胞分画に変化がなかったことから、TAE226 による抗線維化効果は、早期の炎症を抑制することによるものではなく、直接肺線維芽細胞に作用することによって得られた効果であると考えられた。さらに、ヒト IPF 肺組織の免疫染色の結果、FAK Y397 のリン酸化が肺間質細胞および過形成した II 型肺胞上皮で確認され、FAK の活性化が生じていることが確認された(データ未掲載)。以上の結果から IPF においても FAK が線維化病態に関与している可能性が示唆されるとともに、FAK は肺線維症治療の有力な標的分子になり得ると考えられた。

しかしながら今回用いた TAE226 については、IGF-1 レセプターやインスリンレセプターに対する阻害作用があり血糖値に影響を及ぼすことが報告されている⁹⁾。我々の検討でも TAE226 投与によりマウスの血糖が低下傾向となることが確認され、また高用量の TAE226 ではマウスに対する毒性が認められた。現在さらに FAK への特異性を高めた阻害薬が開発されつつあり⁹⁾、今後このような第2世代の FAK 阻害薬を用いた検討が必要と思われる。

文 献

- 1) Aono Y et al. Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1279-1285, 2005.
- 2) Brigstock DR et al. The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol* 178:169-175, 2003
- 3) Lasky JA et al. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol* 275:365-371, 1998.
- 4) Königshoff M et al. WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 119:772-787, 2009.
- 5) Leask A et al. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci* 119:4803-4810, 2006
- 6) Batmunkh R, et al. CCN6 as a profibrotic mediator that stimulates the proliferation of lung fibroblasts via the integrin β 1/focal adhesion kinase pathway. *J Med Invest.* 58(3-4):188-96, 2011.
- 7) Thannickal VJ, et al. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 278:12384-12389, 2003.
- 8) Kinoshita K, et al. Antifibrotic effects of focal adhesion kinase inhibitor in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013 49(4):536-43, 2013.
- 9) Kawahara E et al : Discovery of potent and selective focal adhesion kinase inhibitors. *Eur J Cancer* 6:43, 2008

マウスブレオマイシン肺臓炎モデルにおける 細気管支上皮細胞の役割に関する研究

濱田 直樹¹ 横山 哲也¹ 緒方 彩子¹ 鈴木 邦裕¹
池田 知佳¹ 前山 隆茂¹ 桑野 和善^{2*} 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日後のBAL液の解析、組織学的評価を施行した。また、マウス肺より細気管支上皮細胞をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法にて選択的に採取し、マイクロアレイにて網羅的に解析した。

【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、総蛋白質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質量に関してはBLM投与による有意な変化は認められなかった。またマイクロアレイでは、ナフタレン単独投与群とナフタレン+BLM投与群と比較して、5倍以上上昇していたのは11遺伝子、5倍以上低下していたのは14遺伝子であった。

【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。

¹ 九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設

² 東京慈恵会医科大学内科学講座呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者