

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200mg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。また、①-④群について、day 14に、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よって選択的に採取し、マイクロアレイにて網羅的に解析した。

(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与単独群、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も、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。

細気管支上皮細胞のマイクロアレイ解析による遺伝子発現

マウス BLM 肺臓炎における細気管支上皮細胞に対する影響を検討するために、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により細気管支上皮を選択的に採取し、マイクロアレイ法によって網羅的に遺伝子解析を行った。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(図1)。現在、更に詳細に解析し論文投稿準備中である。

D. 考 察

気道上皮傷害と肺胞機能低下の関係の詳細はまだまだ不明であるが、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

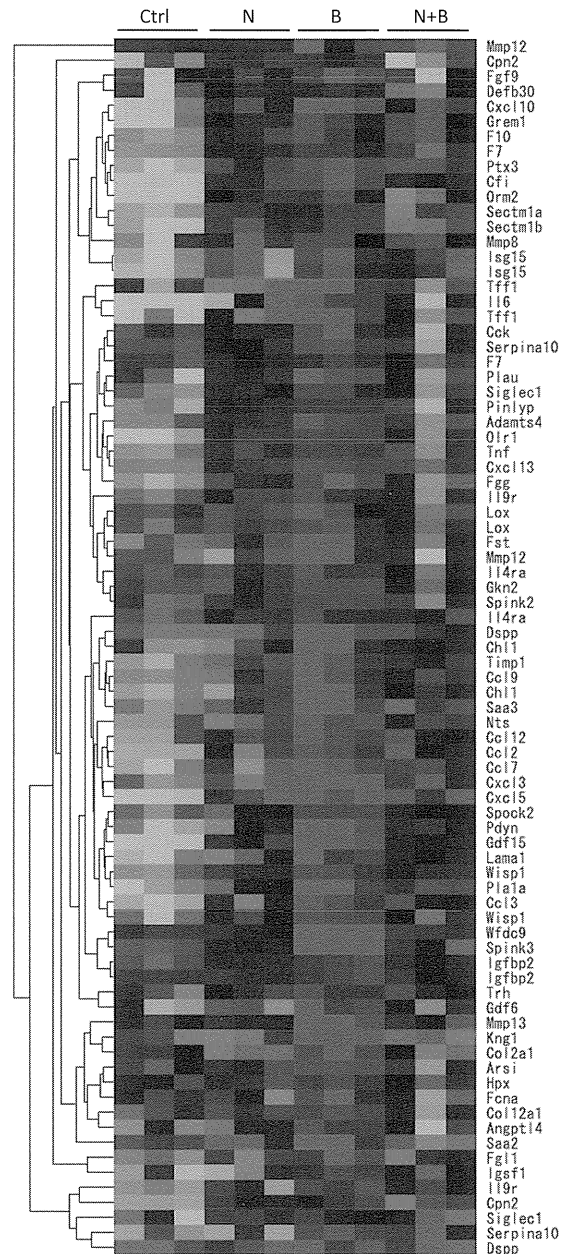


図1. The Gene expression microarray analysis of bronchiolar epithelial cells obtained by the laser microdissection method at d 16.
N = naphthalene;
B = bleomycin;
N+B = bleomycin following naphthalene.

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へ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. 非常に複雑な系が働いていると考えられるが, 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. 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

上皮間葉転換(Epithelial Mesenchymal Transition)を 標的とした特発性肺線維症治療の試み

加藤 元康¹ 高橋 史行¹ 佐藤 匡¹ 佐々木洋子² 林 秀美²
畑 幸江² 吉岡 泰子¹ 守尾 嘉晃¹ 佐々木信一¹ 瀬山 邦明¹
丹羽眞一郎^{2,3} 佐谷 秀行³ 高橋 和久^{1*}

特発性肺線維症(IPF)は肺において高度の線維化が進行し、確立した治療法がない難治性疾患である。近年、肺線維化において、上皮間葉転換(Epithelial Mesenchymal Transition; EMT)の重要性が示唆されている。我々は抗アレルギー薬であるTranilastに着目し、EMT阻害及び肺線維化の抑制効果を検討した。マウスへのBleomycin経静脈的投与により肺線維症モデルを作成し、Tranilast経口投与による肺線維化の抑制効果を病理学的に評価、肺含有コラーゲン量を確認したところTranilastは線維化やコラーゲン増加を抑制し、免疫組織染色におけるFibronectinの発現も抑制した。一方、ヒト肺胞上皮細胞株であるA549をTGFβ2で刺激しEMTを誘導した。更にTranilastを添加、48時間後にmRNA及びタンパクを抽出し、EMT阻害効果を上皮系、間葉系マーカーを用いて検討した。TranilastはA549細胞においてTGFβ2誘導性EMTによる上皮系マーカーであるE-cadherinの発現消失を改善し、間葉系マーカーであるN-cadherinの発現、細胞外マトリックスの産生増加、TGF2誘導性Smad2, 3のリン酸化を抑制した。またWound Healing Assayで細胞遊走能の検討を行いTranilastによる抑制を確認した。TranilastはTGFβ2誘導性のEMTに伴う細胞外マトリックス産生を抑制することより、IPF治療に有用である可能性が示唆された。

¹ 順天堂大学大学院医学研究科呼吸器内科

² リンク ジェノミクス

³ 慶應義塾大学大学院先端医学研究科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

【背景・目的】

特発性肺線維症 (IPF) は肺において高度の線維化が進行し、確立した治療法がない原因不明の難治性疾患であり [1], 近年, IPF の肺線維化病態において上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition; EMT) の重要性が示唆されている [2] [3] [4] [5]. 我々は抗アレルギー薬として日常診療に使用され, 最近では腎線維症における線維化抑制効果も報告されている Tranilast に着目し [6], その EMT 阻害及び肺の線維化抑制効果を検討した.

【方 法】

・ブレオマイシン肺線維症モデル

12 週齢の ICR オスマウスを使用した. ブレオマイシン (BLM) 10mg/kg を生理食塩水で溶解し, 尾静脈より 5 日間連続で経静脈的に投与した [7]. Tranilast (400mg/kg) の経口投与は経口ゾンデを用いて, BLM 投与開始日から 8 日目より 20 日目まで投与し, 22 日目に検体を採取した. 摘出した肺組織は, 病理標本作製, またはコラーゲン含有量の測定に用いた. 病理学的評価としてはヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色, マッソン・トリクローム (MT) 染色を行い, Ashcroft score [8] によりスコア化した. 肺でのコラーゲン含有量の測定は Sircol Collagen Assay を用いて行った. Fibronectin による免疫組織染色においても評価を行った.

・A549 による EMT 誘導モデル

ヒト肺胞上皮細胞株 (A549) を播種し, 24 時間後に TGF β 2 5ng/ μ l で刺激し EMT を誘導した. 更に Tranilast を 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, それぞれの濃度で TGF β 2 と同時に添加, または TGF β 2 で刺激した 24 時間後に添加した. 薬剤の EMT 阻害効果の評価, 及び線維化抑制効果としては, 遊走能の評価, RNA, タンパクレベルでの上皮, 間葉系マーカーの評価によって行った.

遊走能に関しては Wound Healing Assay を行った. A549 細胞を播種 48 時間後に傷つけ, 及び TGF β 2 と薬剤による刺激を行い, 48 時間後に傷面積の評価を行った.

Tranilast 投与 48 時間後に mRNA 及びタンパクを抽出し, EMT 阻害効果を上皮系, 間葉系マーカーの

定量的 PCR, Western blot 法, 及び免疫蛍光細胞染色で確認した. また Tranilast の標的探索として Smad2, および Smad3 のリン酸化の評価を Western blot 法で行った. この系のみは A549 細胞への TGF β 2 での刺激 30 分後でタンパクを抽出し評価に使用した.

【結 果】

・ブレオマイシン肺線維症モデルでの評価

Tranilast の肺線維化抑制効果について病理学的に Ashcroft score を用いて評価した. BLM 投与によって増加する線維化病変は Tranilast により改善した. (Figure. 1A) また BLM 投与により増加する肺含有コラーゲン量を Tranilast は抑制し, 免疫組織染色における Fibronectin の発現も抑制した. (Figure. 1B)

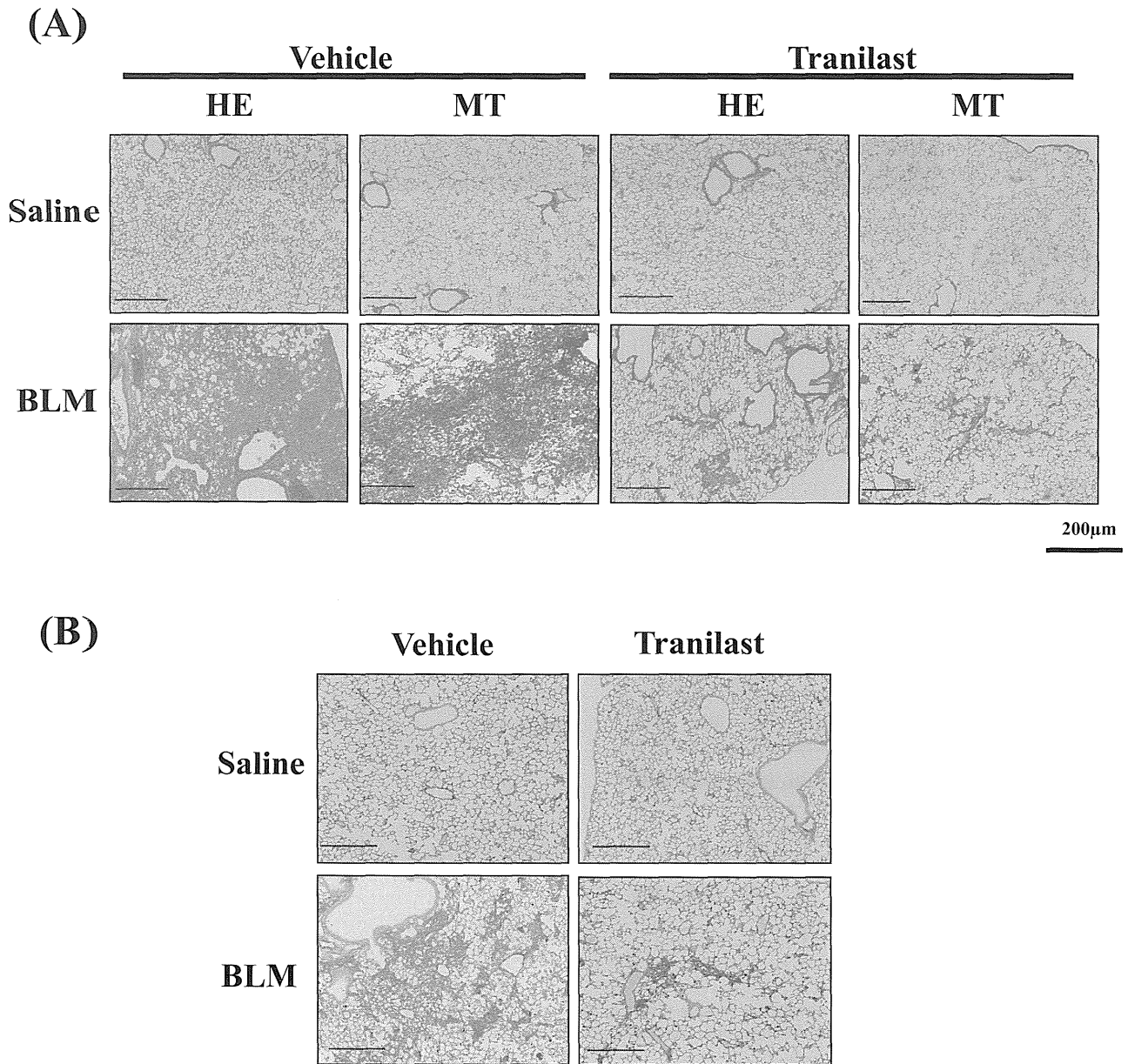
・A549 による EMT 誘導モデルでの評価

遊走能の抑制効果を Wound Healing Assay により確認した. EMT により亢進した細胞遊走能は Tranilast 100 μ M 以上で抑制されることを確認した. (Figure. 2A)

また EMT マーカーの評価を Western blot 法等でを行った. Tranilast は A549 細胞において TGF β 2 誘導性 EMT による上皮系マーカーである E-cadherin の発現消失を改善すること, 間葉系マーカーである N-cadherin の発現, 及び細胞外マトリックス (Fibronectin, IV 型コラーゲン) の産生増加を著明に抑制することを確認した (Figure. 2B). TGF β 2 刺激 24 時間後による Tranilast の添加での各マーカーの評価も行い, TGF β 2 と Tranilast 同時刺激と同等の結果を得た. また TGF β 2 誘導性 Smad2, Smad3 のリン酸化も抑制した. (Figure. 2C)

【結 論】

Tranilast は TGF β 2 誘導性の EMT に伴う ECM 産生を抑制することより, IPF 治療に有用である可能性が示唆された. Tranilast による TGF β 2 誘導性 Smad2, 3 のリン酸化抑制がこの機序の一つと考えられた.



Kato. M, et al.

Figure.1

(A) Histological examination of the antifibrotic effects of tranilast on bleomycin-induced lung fibrosis. Mice were intravenously treated with bleomycin (BLM). Tranilast (400 mg/kg/day) was treated by oral gavage. On day 22, mice were sacrificed and histological examination was performed by hematoxylin–eosin (HE) staining and Masson’s trichrome (MT) staining.

(B) Examination of effects of tranilast on the accumulation of fibronectin in the BLM-induced fibrosis model by immunohistochemistry (IHC).

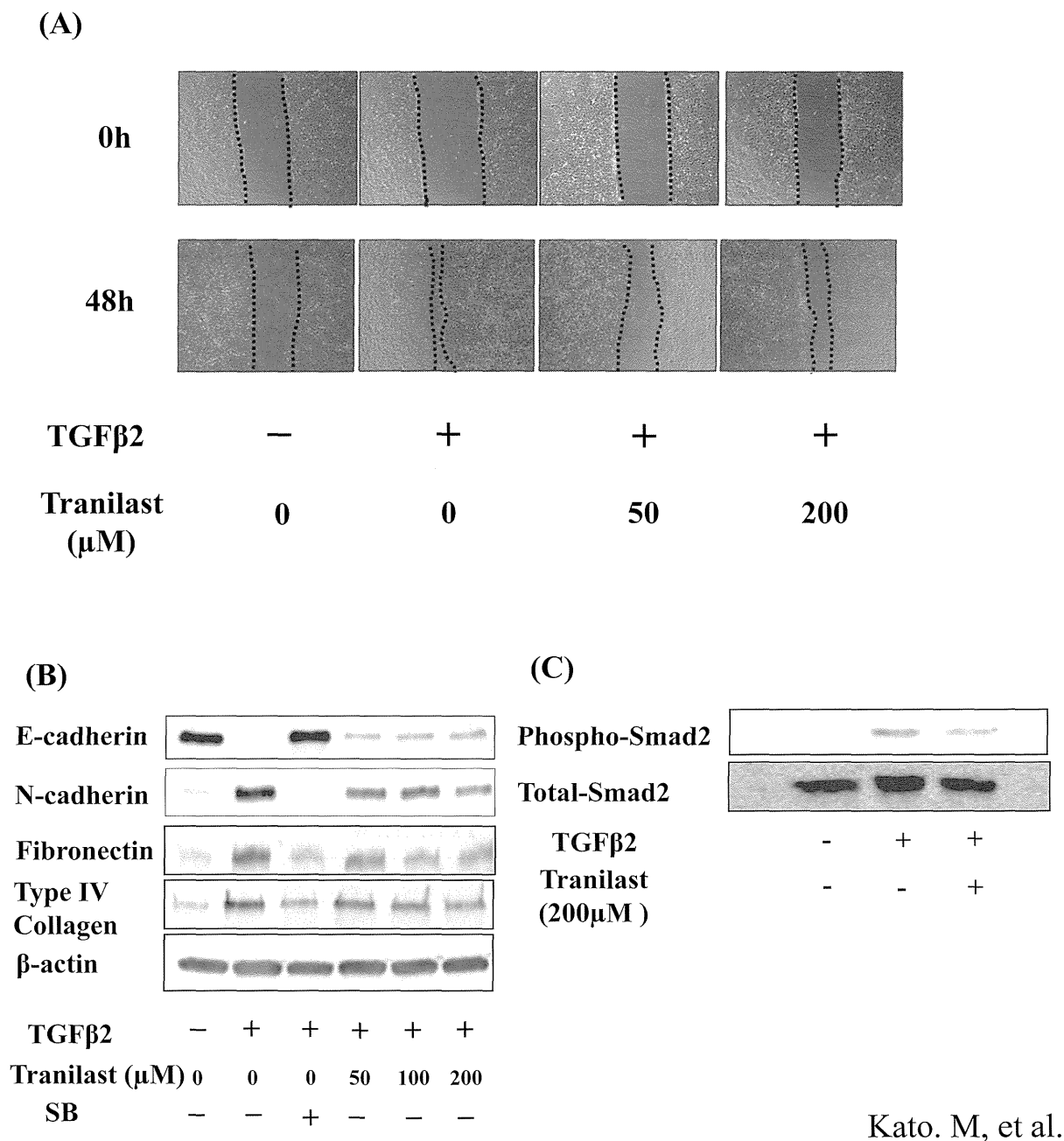


Figure.2
 (A) A sterile plastic micropipette tip was used to make a wound by scratching a monolayer of A549 cells. Migration of cells into the wound area was analyzed by microscopy after 48 hours from scratching. Treatment of tranilast significantly inhibited wound healing at a dose of 100μM.
 (B) A549 cells were stimulated with TGFβ2 (5 ng/ml) in the presence of DMSO, tranilast (50-200 μM), or SB431542 (SB) (5 μM) for 48 hours and the lysates were blotted for E-cadherin, N-cadherin, fibronectin, and type IV collagen. β-actin was used as loading control.
 (C) A549 cells were treated without or with TGFβ2 (5 ng/ml) in combination of DMSO (-), or tranilast (200 μM) for 30 minutes. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies to phospho-Smad2 and Smad2.

Kato. M, et al.

【学会発表】

Kato M, Takahashi F, Sato T, Ko R, Yagishita S, Nurwidya F, Kobayashi I, Hoshika Y, Murakami A, Yoshioka M, Shimada N, Yoshioka Y, Takahashi M, Saya

H, Takahashi K.

Tranilast inhibits pulmonary fibrosis by suppressing TGFβ-mediated extracellular matrix protein production.

Congress of European respiratory society (ERS) 2013

Kato M, Takahashi F, Sato T, Nurwidya F, Kobayashi I, Hoshika Y, Murakami A, Ko R, Yagishita S, Yoshioka M, Shimada N, Yoshioka Y, Takahashi M, Takahashi K.

Tranilast inhibits pulmonary fibrosis by suppressing TGF β -mediated extracellular matrix protein production.

Congress of Asian Pacific Society of Respiriology (APSR) 2013

加藤元康, 高橋史行, 佐藤匡, Nurwidya Fariz, 村上朗子, 小林功, 星加義人, 金丸良太, 高遼, 柳下薫寛, 菅野康二, 村木慶子, 宿谷威仁, 小山良, 吉岡正剛, 嶋田奈緒子, 吉岡泰子, 佐谷秀行, 高橋和久

上皮間葉転換を標的とした特発性肺線維症治療の試み

第53回日本呼吸器学会総会2013

加藤元康, 高橋史行, 畑幸江, 佐々木洋子, 佐藤匡, Fariz Nurwidya, 小林功, 金丸良太, 高遼, 柳下薫寛, 嶋田奈緒子, 吉岡泰子, 丹羽眞一郎, 佐谷秀行, 高橋和久

上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition) を標的とした特発性肺線維症治療の試み

第16回間質性肺疾患分子病態研究会 2013

【参考文献】

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**(6): p. 788-824.

2) Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.* Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.

3) Harada, T., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in human lungs with usual interstitial pneumonia: quantitative immunohistochemistry.* Pathol Int, 2010. **60**(1): p. 14-21.

4) Willis, B.C., R.M. duBois, and Z. Borok, *Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung.* Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(4): p. 377-82.

5) Willis, B.C., et al., *Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor- β 1.* The American Journal of Pathology, 2005. **166**(5): p. 1321-1332.

6) Qi, W., et al., *Tranilast attenuates connective tissue growth factor-induced extracellular matrix accumulation in renal cells.* Kidney Int, 2006. **69**(6): p. 989-95.

7) Oku, H., et al., *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**(1-3): p. 400-8.

8) Ashcroft, T., J.M. Simpson, and V. Timbrell, *Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale.* J Clin Pathol, 1988. **41**(4): p. 467-70.

骨形成因子 bone morphogenic proteins (BMPs) の 肺線維化に果たす役割

武政 聡浩 石井 芳樹*

【目的】肺の線維化はさまざまな疾患で発生する炎症の遷延化や高度肺損傷に伴って生じるが、線維化の程度は予後悪化の重要な因子である。線維化においてTGF- β (transforming growth factor- β)は中心的な役割を果たすとされるが、その抑制に関連した治療のみでは適切な治療法に結びついていない。そこで、肺損傷後の組織修復に関連した因子の検討が不可欠と考えられる。組織修復への関連が示唆される因子に骨形成因子 bone morphogenic proteins (BMPs)があり、肺損傷と線維化における肺局所のBMPsの変化と役割をbleomycin(BLM)誘導肺線維化モデルで検討する。

【方法】マウスに対しBLMを経気道的に投与し、肺線維化モデルを作成した。BLM投与後の肺におけるBMPsの変化を測定し、肺線維化への関与が強いと考えられるBMPsを絞る。BLMによる肺線維化が軽減され修復が始まるBLM経気道的投与後21日目に、肺組織修復に重要と考えられるBMPsのsiRNA(small interfering RNA)を経気道的に投与し線維化遷延が生じるか検討する。

【結果】BLM投与後21日目に肺線維化が最も強く発現するが、その時にBMP-4とBMP-6のmRNAとタンパクの発現が低下する。その他のBMPsは有意な変化を示さず、肺におけるBMPsの拮抗因子と考えられているgremlinも有意な変化を認めなかった。BLM経気道的投与後21日目にBMP-4とBMP-6のsiRNAを経気道的投与すると、肺線維化の軽減が消失し線維化が遷延した。ここから、BMP-4とBMP-6は肺線維化の修復因子として関与する可能性が示唆された。

【結論】骨形成因子であるBMP-4とBMP-6は肺の線維化修復に関与し、発現低下は線維化遷延につながる可能性がある。また、これらの因子の発現増強が線維化改善に関与する可能性が示唆される。

TABLE 1. Real-time PCR primer sequences

Gene	Forward primer	Reverse primer
TGF- β	5'-CGGGGCGACCTGGGCACCATCCATGAC-3'	5'-CTGCTCCACCTTGGGCTTGCGACCCAC-3'
BMP-1	5'-AGCAGGCTGCAGTTCTCAGACAGC-3'	5'-GAATGTGTTCCGGGCATAGTGCAT-3'
BMP-2	5'-GGGACCCGCTGTCTTCTAGT-3'	5'-TCAACTCAAATTCGCTGAGGAC-3'
BMP-3	5'-GACTTCGAGGCGACACTTCTA-3'	5'-GCCGGTAAAGATCCCTCATGTAA-3'
BMP-4	5'-GACTTCGAGGCGACACTTCTA-3'	5'-GCCGGTAAAGATCCCTCATGTAA-3'
BMP-5	5'-TTACTTAGGGGTATTGTGGGCT-3'	5'-CCGTCTCTCATGGTTCCGTAG-3'
BMP-6	5'-AAGACCCGGTGGTGGCTCTA-3'	5'-CTGTGTGAGCTGCCCTTGCT-3'
BMP-7	5'-ACGGACAGGGCTTCTCCTAC-3'	5'-ATGGTGGTATCGAGGGTGGAA-3'
Gremlin	5'-GCAACAGCCGCACTATCA-3'	5'-CCAAGTCGATGGATATGC-3'
GAPDH	5'-GGCATTGCTCTCAATGACAA-3'	5'-CTTGCTCAGTGCCTTGCTG-3'

A. 研究目的

現在利用可能な薬剤でも、実験レベルでは抗肺線維化作用が示唆されている薬剤は多数知られている(1)。しかし、実地臨床での有効性は限られており、肺損傷後の組織修復促進が確立された薬剤はない。肺の線維化で中心的役割を果たすTGF- β の抑制薬がなぜ実地臨床で効果を確認できないのか、その解明は十分でない。TGF- β superfamilyの一員であるbone morphogenic proteins (BMPs)は14種類以上の存在が報告されているが(2)、腎の線維化調節機能(3-5)以外に肺の線維化に対しても何らかの調節作用を有することが推測される。腎の線維化ではBMP-7が関与し、BMP-7の投与で腎障害修復と機能回復が報告されている(3-5)。さらに、BMP-7はTGF- β の作用を抑制する可能性もある(4)。しかし、BMP-7受容体は全身に存在するものの、肺では抗線維化効果を認めないとする報告もあり(6)十分な確認がされていない。また、肺ではBMP-4の関与も示唆されている(7)。一方、BMPsの活性を阻害する分泌蛋白であるBMP拮抗因子はBMPsやその受容体と比べ臓器特異性が高いとされ、肺ではgremlinの関与が示唆されている(7)。しかし、肺に線維化を生じさせる刺激次第でそれらの関与が変化する可能性もあり、結論が出ていない(6, 7)。そこで組織修復、線維化修復に関与する因子としてBMPsとその阻害因子の関与を、bleomycin(BLM)を経気道的に投与し

て肺線維化を作成し(BLM誘導肺線維症モデル)、このモデルで検討する。

B. 研究方法

1) C57BL/6 マウスにBLM (3mg/kg) を経気道的に投与し肺線維化モデルを作成した。BLM誘導肺線維症モデルにおいて肺組織像とその線維化に関するAschcroft score比較, Sircol collagen assay(Biocolor)を用いた肺のコラーゲン定量比較を行う。

2) Homogenized lung sampleを使用してBMPsのどれが線維化に関与するのかreal-time PCRで検討する(Lifetechnologies)(TABLE 1)。

2) 関与が示唆されるBMPsを絞り、Western blotでタンパク発現に関して検討する(R & D Systems, Cell Signaling Technology)。BMP拮抗因子に関しては、報告されているgremlin(7)に関して検討する(R & D Systems)。

3) 次に肺線維化が強く現れる時期に(BLM投与後14-21日後)、BMPsのshort interfering RNA(siRNA, 1mg/kg)を経気道的に投与し(Sigma-Aldrich)、肺局所での発現を抑制することで線維化が増強・遷延するかをAschcroft score比較や、Sircol collagen assay(Biocolor)によるコラーゲン定量比較で検討す

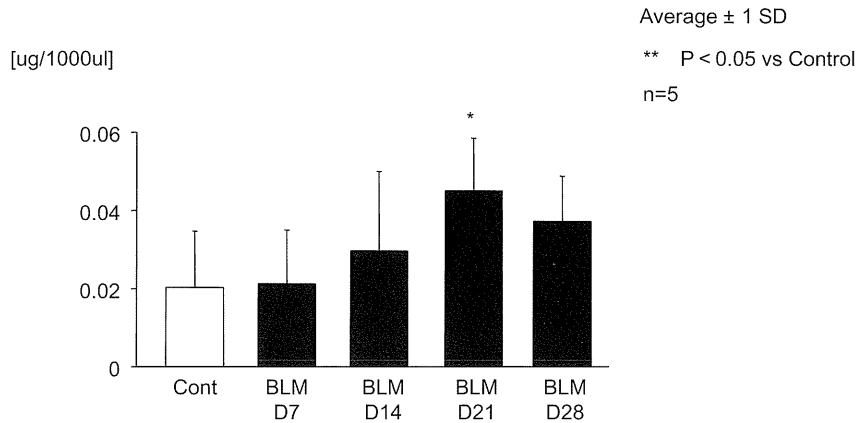


FIGURE 1. Collagen content

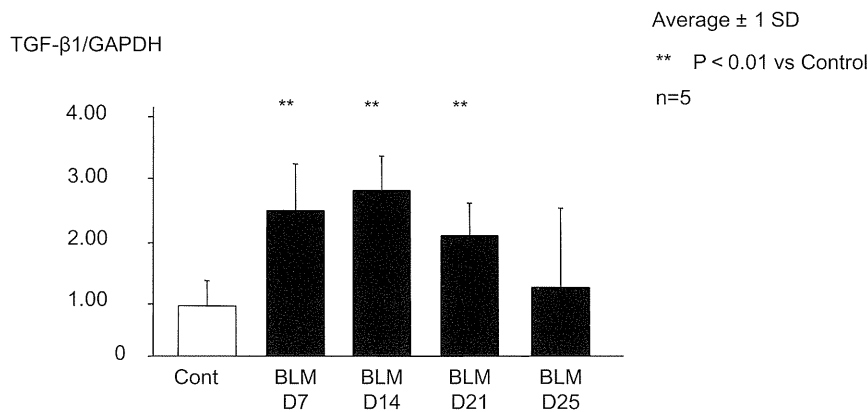


FIGURE 2. Real-time PCR

る。

C. 研究結果

① 左肺全体の Sircol collagen assay による肺コラーゲン定量比較 (FUGURE 1)

今回の bleomycin 誘導肺線維症モデルにおいて左肺全体のコラーゲン量を測定すると、BLM 投与後 21 日目にコラーゲン量は最高となり、有意な増加を認めた。

② 肺組織中 TGF-β mRNA 発現 (FUGURE 2)

肺組織中 TGF-β mRNA 発現を real-time PCR で評価したところ、BLM 投与後 7 日から 21 日に発現が増強され、その後低下した。

③ 肺組織中 BMP-1, 2, 3, 5 の mRNA 発現 (FUGURE 3) と BMP-4, 6, 7, gremlin の mRNA 発現 (FUGURE

4)

肺組織中 BMPs の mRNA 発現の変化は、BMP-4 と BMP-6 のみが有意に低下した。その他の BMPs は有意な変化を示さず、BMPs 拮抗因子である gremlin も有意な変化を示さなかった。

④ 肺組織中の BMPs および gremlin のタンパク変化 (FUGURE 5)

肺組織中における BMPs の mRNA 発現変化と同様に、肺組織中 BMP-4 と BMP-6 はタンパク量が低下するが、BMP-7 と gremlin のタンパクは有意な変化を示さなかった。

⑤ 経気道的に投与した BMP-4 と BMP-6 の siRNA (siBMP-4, siBMP-6) による組織所見の変化 (FUGURE 6)

BLM 投与後 21 日に BMP-4 と BMP-6 の siRNA (siBMP4, siBMP6) を投与すると、その後 7 日後 (BLM 投与後 28 日) において肺線維化改善を有意に抑制し

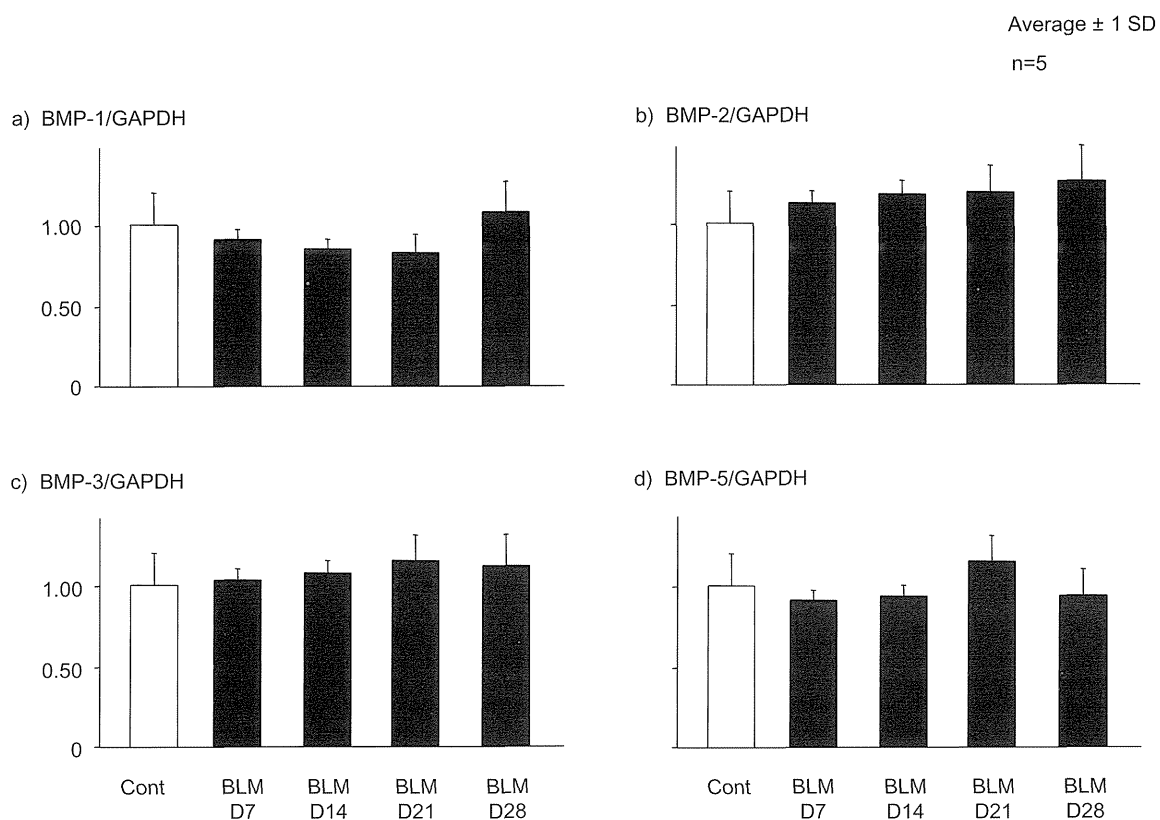


FIGURE 3. Real-time PCR

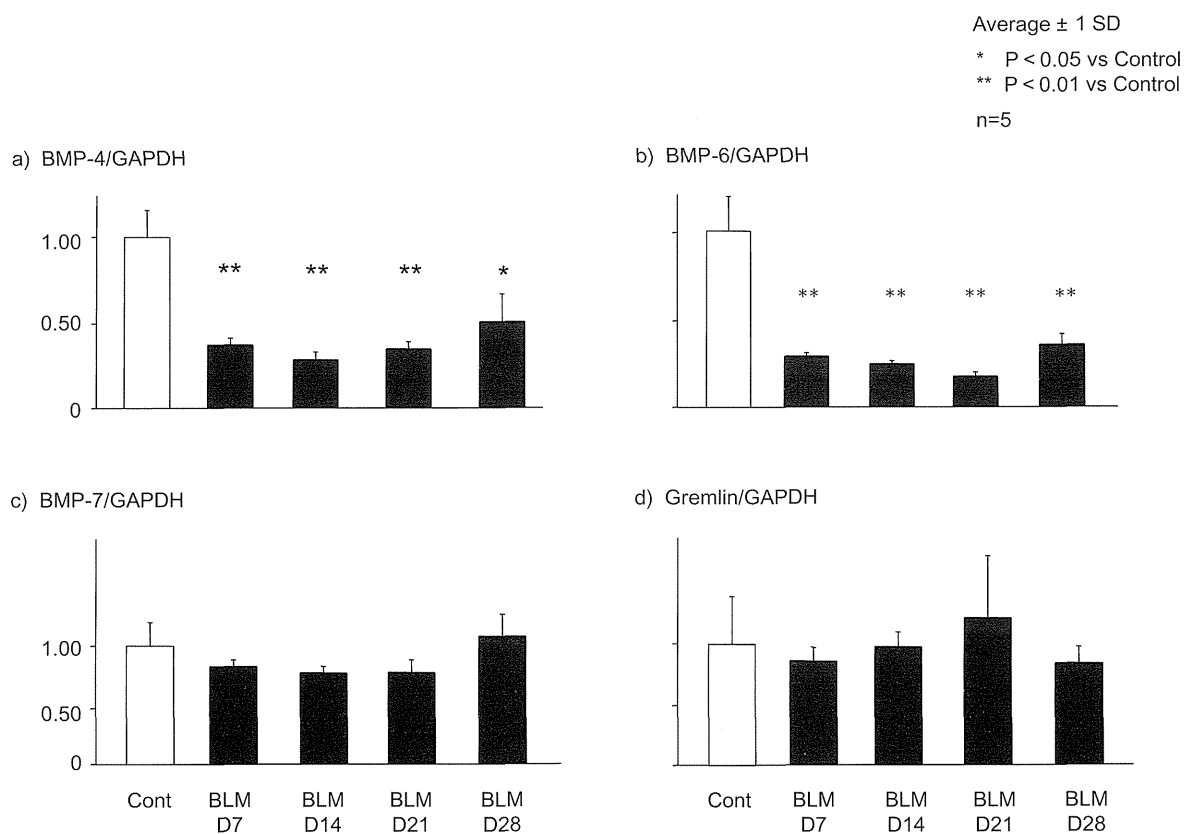


FIGURE 4. Real-time PCR

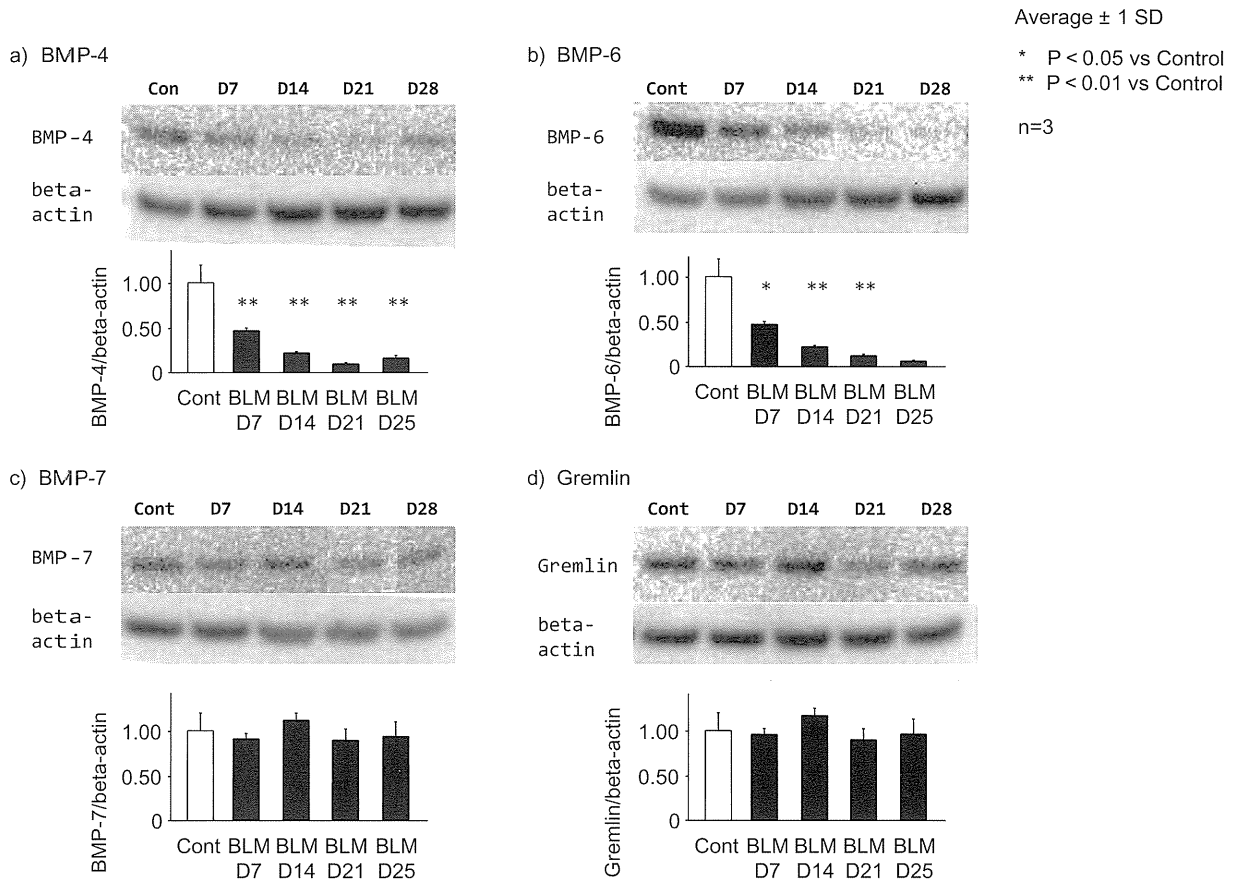


FIGURE 5 Western blot

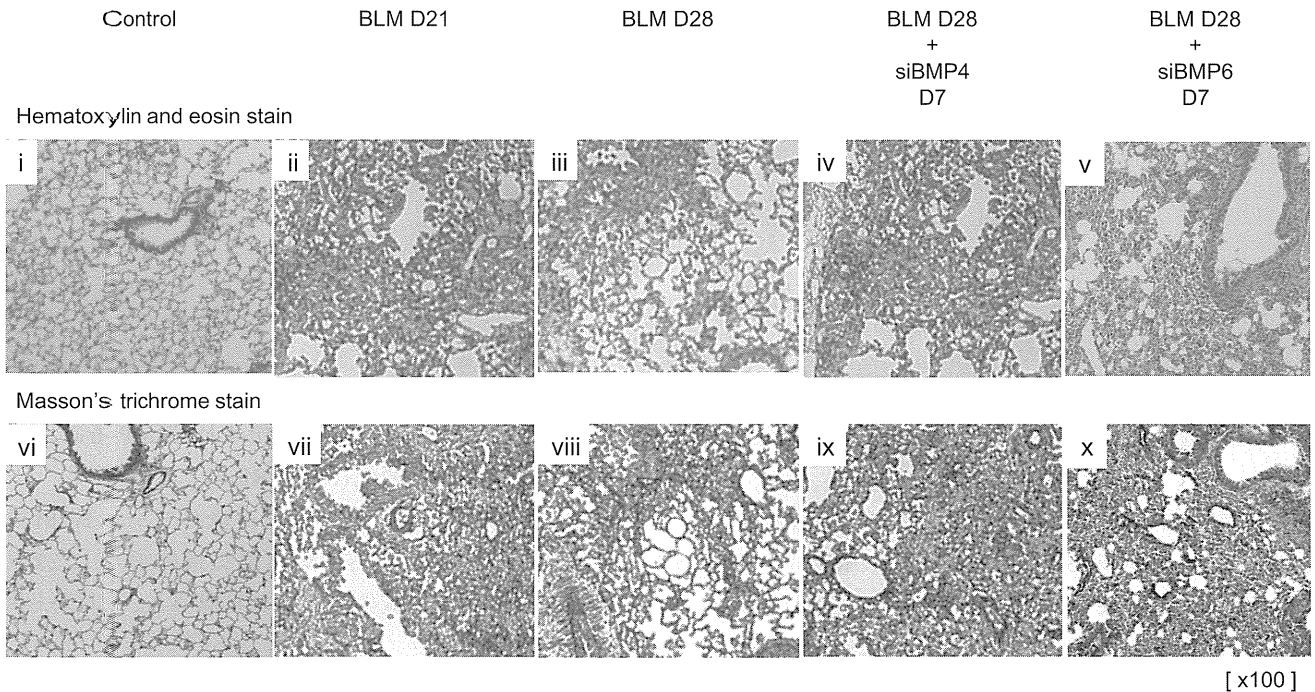


FIGURE 6. Pathological findings

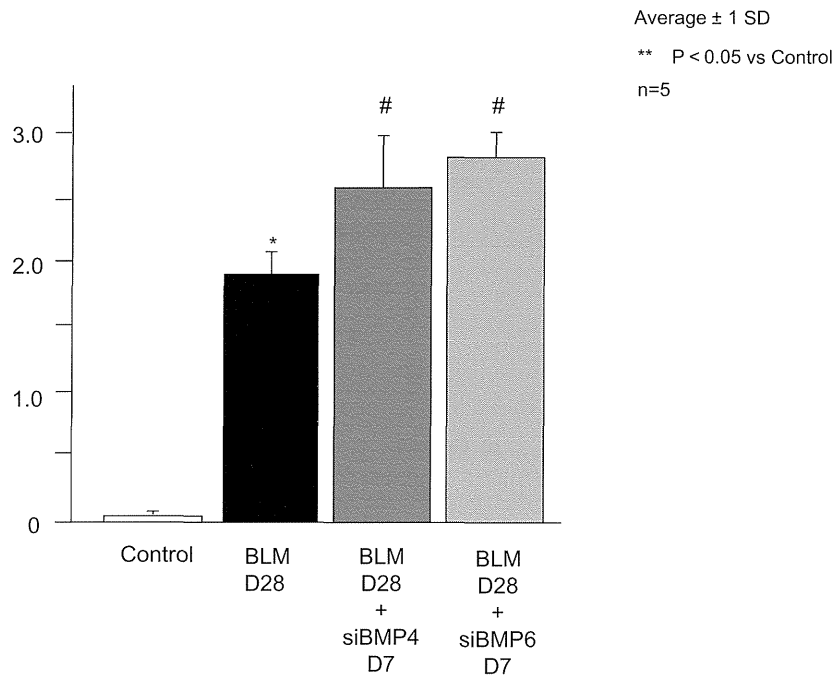


FIGURE 7. Fibrosis scoring

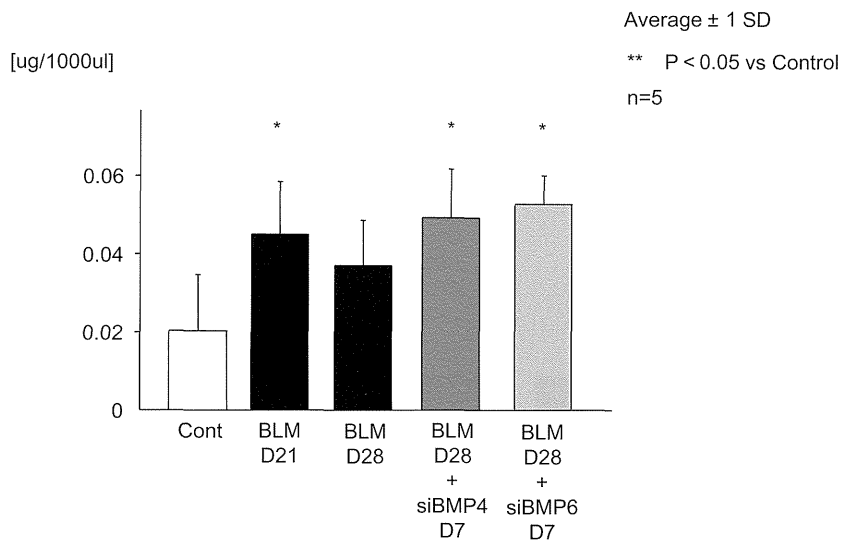


FIGURE 8. Collagen content

線維化が遷延した。

⑥ 経気道的に投与した siBMP-4 と siBMP-6 による pathological Fibrosis Score の変化 (FUGURE 7)

Aschcroft score を用いて BLM 投与後 28 日における線維化を比較した。BLM 投与後 21 日に siBMP4, siBMP6 を経気道的に投与すると、その後 7 日目にあたる BLM 投与後 28 日目の肺線維化改善が有意に抑制され、線維化が遷延した。

⑦ 経気道的に投与した siBMP-4 と siBMP-6 による肺コラーゲン量の変化 (FUGURE 8)

左肺全体のコラーゲン量を定量しても、BLM 投与後 21 日の siBMP4, siBMP6 経気道的投与で 28 日目のコラーゲン量減少が有意に抑制され、コラーゲン残存が遷延した。

D. 考察

腎の線維化ではBMP-7が関与し、BMP-7の投与で腎障害修復と機能回復が報告されているが(3-5)、肺では否定的な報告がある(6)。今回のBLM誘導肺線維症モデルによる検討でも、BMP-7は線維化過程で有意な変化を示さなかった。また、asbestos誘導肺線維化モデルではBMPs拮抗因子であるgremlinの上昇を認めたが(7)、今回のBLM誘導肺線維症モデルでは有意な変化を認めなかった。この点から、BMP-7とBMPs拮抗因子gremlinは肺線維化に必ずしも直接的に関与するとは限らず、その場合は他のBMPsが関わる可能性が考えられた。

肺に線維化を生じさせる刺激次第で線維化とその修復に関与する因子が変化する可能性がある。BMPsに関しても、今後はrecombinant BMPsを用いた治療効果の検討が必要とされる。また、運動選手のサプリメントとしても利用されているagmatineは体内のBMPsを増加させると報告されているが(9)、我々の検討では肺組織中でも増加が確認されている(data not shown)。これにより肺修復と線維化改善が得られるか検討する必要がある。臨床的に利用可能であるagmatineにより、ヒト肺内でBMPsを増加することができれば臨床応用を期待できる可能性がある。これにより実地臨床への応用が可能となり、組織修復や組織再生を含めた臨床的な治療に発展できる可能性がある。

E. 結論

骨形成因子であるBMP-4とBMP-6は肺の線維化修復に関与し、発現低下は線維化遷延につながる可能性がある。また、これらの因子の発現増強が線維化改善に関与し、治療に発展できる可能性が示唆される。

F. 参考文献

- 1) Takemasa A, Ishii Y, Fukuda T. A neutrophil elastase inhibitor prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2012;40:1475-1482.
- 2) Okada H. Tolloid-like proteinases orchestrate extracellular matrix formation. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:588-589.
- 3) Sugimoto H, LeBleu VS, Bosukonda D, Keck P, Taduri G, Bechtel W, Okada H, Carlson W, Jr., Bey P, Rusckowski M, Tampe B, Tampe D, Kanasaki K, Zeisberg M, Kalluri R. Activin-like kinase 3 is important for kidney regeneration and reversal of fibrosis. *Nat Med* 2012;18:396-404.
- 4) Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. Bmp-7 counteracts tgf-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003;9:964-968.
- 5) Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem* 2005;280:8094-8100.
- 6) Murray LA, Hackett TL, Warner SM, Shaheen F, Argentieri RL, Dudas P, Farrell FX, Knight DA. Bmp-7 does not protect against bleomycin-induced lung or skin fibrosis. *PLoS One* 2008;3:e4039.
- 7) Myllarniemi M, Lindholm P, Ryyanen MJ, Kliment CR, Salmenkivi K, Keski-Oja J, Kinnula VL, Oury TD, Koli K. Gremlin-mediated decrease in bone morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:321-329.
- 8) Shi Y, Gochuico BR, Yu G, Tang X, Osorio JC, Fernandez IE, Riquez CF, Patel AS, Shi Y, Wathlet MG, Goodwin AJ, Haspel JA, Ryter SW, Billings EM, Kaminski N, Morse D, Rosas IO. Syndecan-2 exerts antifibrotic effects by promoting caveolin-1-mediated transforming growth factor-beta receptor internalization and inhibiting transforming growth factor-beta1 signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:831-841.
- 9) Park YM, Lee WT, Bokara KK, Seo SK, Park SH, Kim JH, Yenari MA, Park KA, Lee JE. The multifaceted effects of agmatine on functional recovery after spinal cord injury through modulations of bmp-2/4/7 expressions in neurons and glial cells.

PLoS One 2013;8:e53911.

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Takemasa A, Ishii Y, Fukuda T. A neutrophil elastase inhibitor prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2012;40:1475-1482.
- ② 武政聡浩, 石井芳樹. ALI/ARDS と肺の線維化. 医

学のあゆみ 別冊 ARDS のすべて (石井芳樹 編) pp114-120. 医歯薬出版株式会社, 東京, 2010.

2. 学会発表

- ① 武政聡浩, 石井芳樹, 福田健. ブレオマイシン誘導肺線維化モデルにおけるエラスターゼ阻害薬の抗線維化作用機序. 2010年7月10日, 東京, 第七回北関東信越呼吸器フォーラム.
- ② 武政聡浩, 石井芳樹, 福田健. ブレオマイシン誘導肺線維化モデルにおけるエラスターゼ阻害薬 (シベレスタット) の抗線維化作用機序. 2010年4月24日, 京都, 第50回日本呼吸器学会学術講演会.

肺上皮細胞傷害に基づく肺線維症発症メカニズムにおける 代償性IL-6シグナルの役割

小林 健^{1,2} 粕谷 善俊² 田中 健介^{1,2} 天野 寛之^{1,2}
藤田 哲雄^{1,2} 梅澤 弘毅^{1,2} 木村 定雄² 巽 浩一郎^{*}

【目的】前回のびまん性肺疾患に関する調査研究報告において、ブレオマイシン (BLM) 誘導性肺線維症マウスモデルの炎症初期に、肺胞Ⅱ型上皮細胞 (AECⅡ) で産生されたIL-6が、オートクライン/パラクラインに作用して、AECⅡでSTAT3, Aktの活性化を促すことを報告した。今回、BLM-マウスモデルの炎症初期においてAECⅡで産生されるIL-6の病態進展への関与機構を検討した。

【方法】ヒトAECⅡの株化A549細胞をPI3K阻害剤、抗IL-6中和抗体存在下でBLMにて刺激し、ウェスタンブロット法にて細胞内シグナルとアポトーシスの関係について検討した。さらに10週令のマウスに、BLMを経気管的に投与後、抗IL-6中和抗体を経気管的に3日間連続投与した。Day 3にYO-PRO-1 iodideとPropidium iodideを経気管的に注入後、肺を摘出し、蛍光顕微鏡にてAECⅡのアポトーシス、ネクローシスについて解析した。また、day 7に肺を摘出し、炎症及び線維化について解析を行った。

【結果】A549細胞において、BLM刺激により細胞死シグナルであるcaspase 8の活性化が誘導され、抗IL-6中和抗体またはPI3K阻害剤存在下では、より顕著となった。一方、IL-6の添加は、BLMにより誘導されるcaspase 8の活性化を抑制した。抗IL-6中和抗体の経気管的投与による肺内IL-6機能阻害下では、BLMにより誘導されるAECⅡのアポトーシスと肺組織の炎症に亢進を認めるとともに、線維化進展の亢進が見られた。肺線維症の病態成立の起点となりうるAECⅡの運命を握る重要因子として、IL-6がオートクライン/パラクライン様式で機能する可能性が示唆された。IL-6は、肺線維症の病態進展において重要な役割をはたすと考えられた。

【結論】抗IL-6療法が関節リウマチを代表とする炎症性疾患で行われ注目されているが、少なくとも、肺線維症/間質性肺炎患者もしくは、これを合併症として有する患者への適応は、慎重な検討を要する。

¹ 千葉大学医学部呼吸器内科

² 千葉大学医学部分子生体制御学

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

はじめに

昨年度のびまん性肺疾患に関する調査研究報告において、ブレオマイシン (BLM) 誘導性肺線維症マウスモデルにおける炎症初期に、肺胞Ⅱ型上皮細胞 (AECⅡ) での IL-6 産生に準じ、主たる IL-6 シグナル伝達分子: STAT3 および Akt の活性化を AECⅡに認めた。この事実は、IL-6 がオートクライン/パラクラインに作用することで、AECⅡの機能調節を介して病態の進展に関わる可能性を示唆した。近年、肺線維症において、AECⅡの機能低下/細胞死が線維化の直接の原因になることが証明され、注目されている¹⁾。いわゆる AECⅡ 傷害-肺線維化成立機構である。そこで、我々が見出した AECⅡにおける IL-6 シグナルが、この成立機構の系譜にどのように関わるか検討したので報告する。

対象と方法

動物

10 週齢の C57BL/6 ♂マウスを使用した。

BLM, 抗 IL-6 中和抗体投与

BLM 3mg/kg を phosphate buffered saline (PBS) で溶解し、Microsprayer (Penn-Century 社) を使用して単回気管内投与した。抗 IL-6 中和抗体 (IL-6-NA) は PBS で希釈し気管内投与した。投与スケジュールは、BLM を day 0 に投与し、6h, 30h (day 1), 54h (day 2) 後に、PBS または IL-6-NA を連続投与した。PBS 投与群、BLM+PBS 投与群、BLM+IL-6-NA 投与群の 3 群に分けて解析した。

Western blot 解析

24-well plate に播種した A549 細胞を、IL-6-NA, PI3K 阻害剤, IL-6 の存在下もしくは非存在下で、BLM (100 µg/ml) で 12 時間刺激後、細胞溶解サンプルを調製し、SDS-PAGE 転写後、Chemiluminescence を用い、抗 cleaved caspase 8 抗体での検出に供した。各レーンのシグナル強度をデンシトメーターにて数値化し、コントロールの β -actin のそれとの比を求め、グラフで表示した。

組織におけるアポトーシスの検出

BLM 投与から 3 日後、マウスを麻酔後に 20ml の PBS を左心室から注入し脱血した。20 ゲージの金属針を気管内に挿入した後に 1ml PBS で 2 回洗浄し、YO-PRO-1 iodide (200 倍希釈) 及び Propidium iodide (PI) (0.1 µg/ml) を含む 1ml の PBS を気管内に注入した。15 分後に、1ml PBS で 3 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒドを気管内投与し、肺を摘出後、over night で 4% パラホルムアルデヒドに浸漬し固定を行った。OCT で包埋したのち、4 µm 厚に薄切した。DAPI で核染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。YO-PRO-1 陽性細胞 (FITC 様蛍光) をアポトーシス細胞、PI 陽性細胞 (Rhodamine 様蛍光) をネクローシス細胞とした。蛍光顕微鏡で撮影した各視野につき、同時に光学顕微鏡で phase contrast image も撮影し、AECⅡの場所を特定した。

組織学的検査

BLM 投与から 7 日後に、20ml の PBS を左心室から注入し脱血した。4% パラホルムアルデヒドを気管内投与し、肺を摘出後、over night で 4% パラホルムアルデヒドに浸漬し固定を行った。OCT で包埋したのち、8 µm 厚に薄切した。Hematoxylin-eosin 染色を行い、組織の炎症、線維化について解析した。

結 果

BLM による AECⅡのアポトーシス誘導に対する IL-6 の効果

BLM で A549 細胞を刺激したところ、caspase 8 の活性化を認めた。BLM 刺激により A549 細胞から産生された内因性 IL-6 を、IL-6-NA により阻害したところ caspase 8 の活性化は亢進した。BLM 刺激後 3 時間以内に活性化を認めた Akt (未発表データ) を、PI3K 阻害剤を用いて阻害したところ、BLM による caspase 8 の活性化はより亢進した (図 1A)。次に外因性の IL-6 の効果を検討した。BLM 刺激による A549 細胞の caspase 8 の活性化は、IL-6 の添加により抑制された (図 1B)。

AECⅡのアポトーシス

BLM 投与群は、PBS 投与群と比べて、YO-PRO-1 陽性の AECⅡを多く認めた。BLM+IL-6-NA 投与群

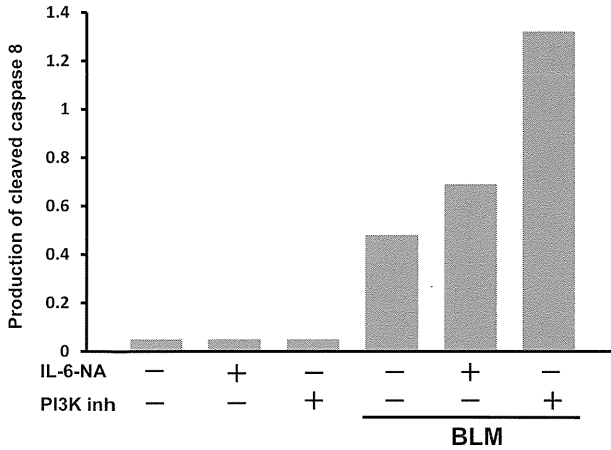


図 1A. BLM 刺激後の A549 細胞内のアポトーシス関連蛋白の変化 (IL-6-NA, PI3K inh 存在下で BLM 刺激)

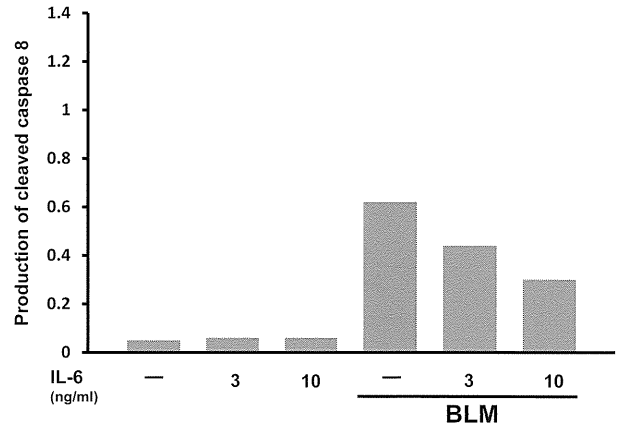


図 1B. BLM 刺激後の A549 細胞内のアポトーシス関連蛋白の変化 (IL-6 存在下で BLM 刺激)

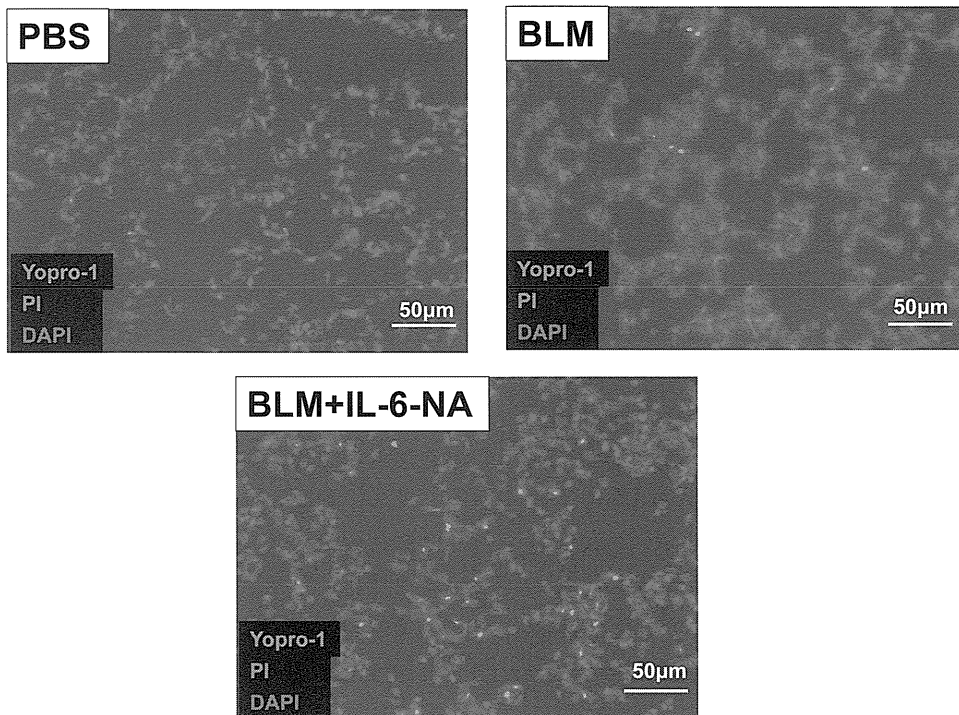


図 2. AEC II のアポトーシス

は、BLM 投与群よりもさらに多くの、YO-PRO-1 陽性の AEC II を認めた。PI 陽性の細胞は、ほとんど認めなかった (図 2)。

肺の組織学的変化

PBS 投与群のマウスの肺は、明らかな炎症細胞浸潤及び線維化を認めなかった。BLM 投与群は、炎症細胞浸潤を認めたが、明らかな線維化病変は認め

なかった。BLM+IL-6-NA 投与群のマウスの肺では、炎症細胞浸潤が増強し、明らかな線維化病変を認めた (図 3)。

考 察

前回のびまん性肺疾患に関する調査研究報告において、BLM 誘導性肺線維症マウスモデルにおける

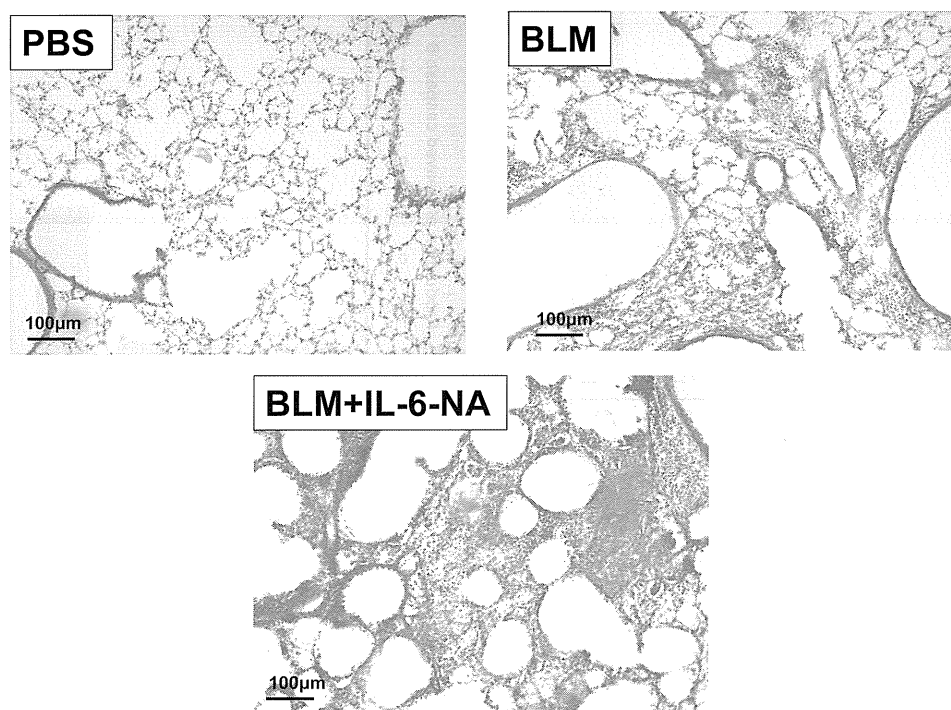


図3. 肺の組織学的変化

炎症初期に、AEC II での IL-6 産生に準じ、主たる IL-6 シグナル伝達分子；STAT3 および Akt の活性化を AEC II に認めた。この事実は、IL-6 がオートクライン/パラクラインに作用することで、AEC II の機能調節を介して病態の進展に寄与する可能性を示唆した。今回、我々が見出した AEC II における IL-6 シグナルが、AEC II の細胞機能もしくは運命に、さらには、病態進展へどのように影響するか検討を加えた。その結果、*in vitro* において、① BLM 刺激下では A549 細胞の Akt シグナルの活性化は survival を促進する。② 添加した外因性 IL-6 は、BLM による A549 細胞のアポトーシスを抑制することが判明した。In vivo においては、IL-6-NA の経気管的投与による肺内 IL-6 機能阻害下では、BLM により誘導される AEC II のアポトーシスと肺組織の炎症所見に亢進を認めるとともに、明らかな線維化所見も認められた。

肺線維症と IL-6 の関連性については、以下のような報告がある；① BLM 投与後の肺の炎症細胞の浸潤と線維化は、野生型マウスに比して IL-6 KO マウスでは抑制される³⁾；② IL-6 あるいは IL-6R 遺伝子をそれぞれアデノウイルスベクターを用いてラット

の肺に導入し、病理組織学的変化を観察した実験では、肺組織の炎症の亢進を認めたが、明らかな線維化の所見は認めなかった³⁾。すなわち、IL-6 が肺線維症の増悪因子であるかどうかについては、意見が分かれており、いまだ結論に至っていない。

近年、肺線維症において、AEC II の機能低下／細胞死が線維化の直接の原因になることが証明され、注目されている¹⁾。BLM 誘導性肺線維症マウスモデルにおいて、AEC II で惹起される IL-6 シグナルと、AEC II のアポトーシス、さらには、肺の線維化との関連について報告した研究は過去に存在しない。そこで我々はまず、AEC II の細胞株である A549 細胞のアポトーシスに対する IL-6 シグナルの関与様式を検討した。アポトーシスシグナルは、cleaved caspase 8 の産生量を指標として判定した。

今回の我々の実験では、BLM 刺激下の A549 細胞の cleaved caspase 8 の産生亢進は、PI3K 阻害剤存在下で、さらに亢進したことから、Akt の活性化は、survival を促進する方向に働いていると考えられた。この事実は、従来の、IL-6 受容体の下流で活性化される JAK-STAT、PI3K-Akt シグナルが細胞の survival シグナルとして機能するという報告⁴⁾に矛盾しない。