

【平成24年度】

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、引き続き修復、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- β 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¹⁾。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²⁻⁵⁾。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⁶⁻⁷⁾。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⁸⁾。

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⁹⁾。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⁹⁾。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¹⁰⁻¹¹⁾。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¹²⁾。

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- β 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 α -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- β で刺激すると、筋線維芽細胞へ分化し、 α -SMA と type I collagen の発現が亢進した。LC3B と ATG5 に対する siRNA を

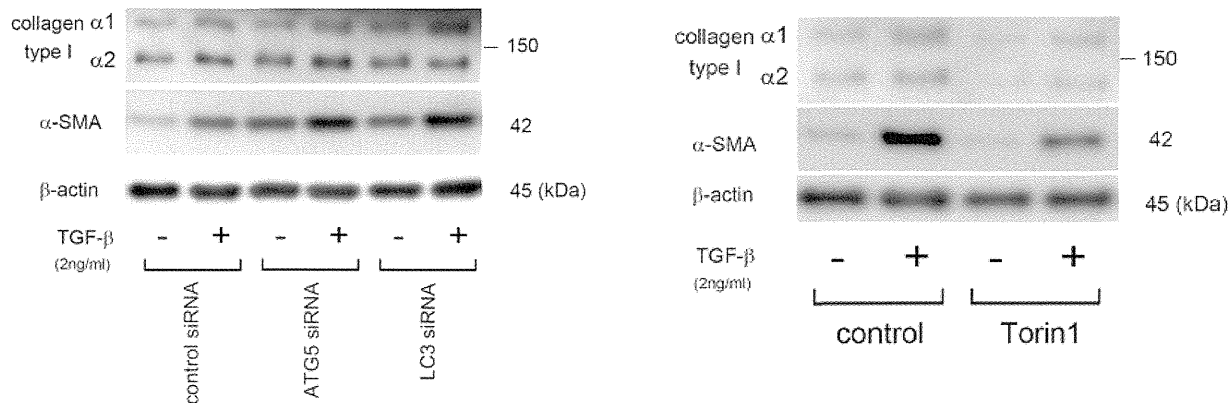


図1. オートファジー阻害、亢進のTGF-βによる筋線維芽細胞分化に及ぼす影響

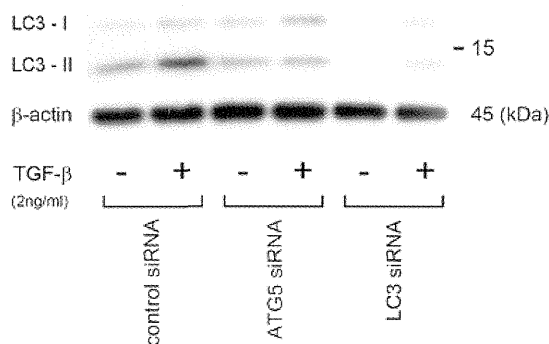


図2. TGF-βのオートファジーへ及ぼす影響

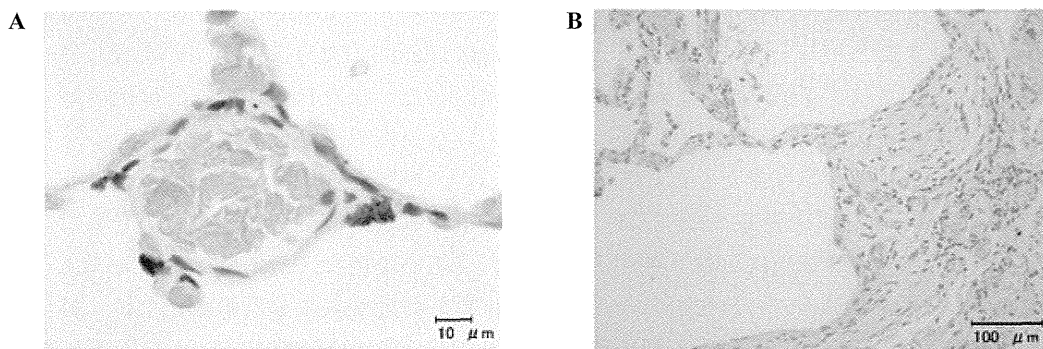


図3. 肺組織におけるLC3蛋白発現
抗LC3抗体染色：A 正常構造領域 (IPF) B 軽度から中等度線維化部位 (IPF)

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)。

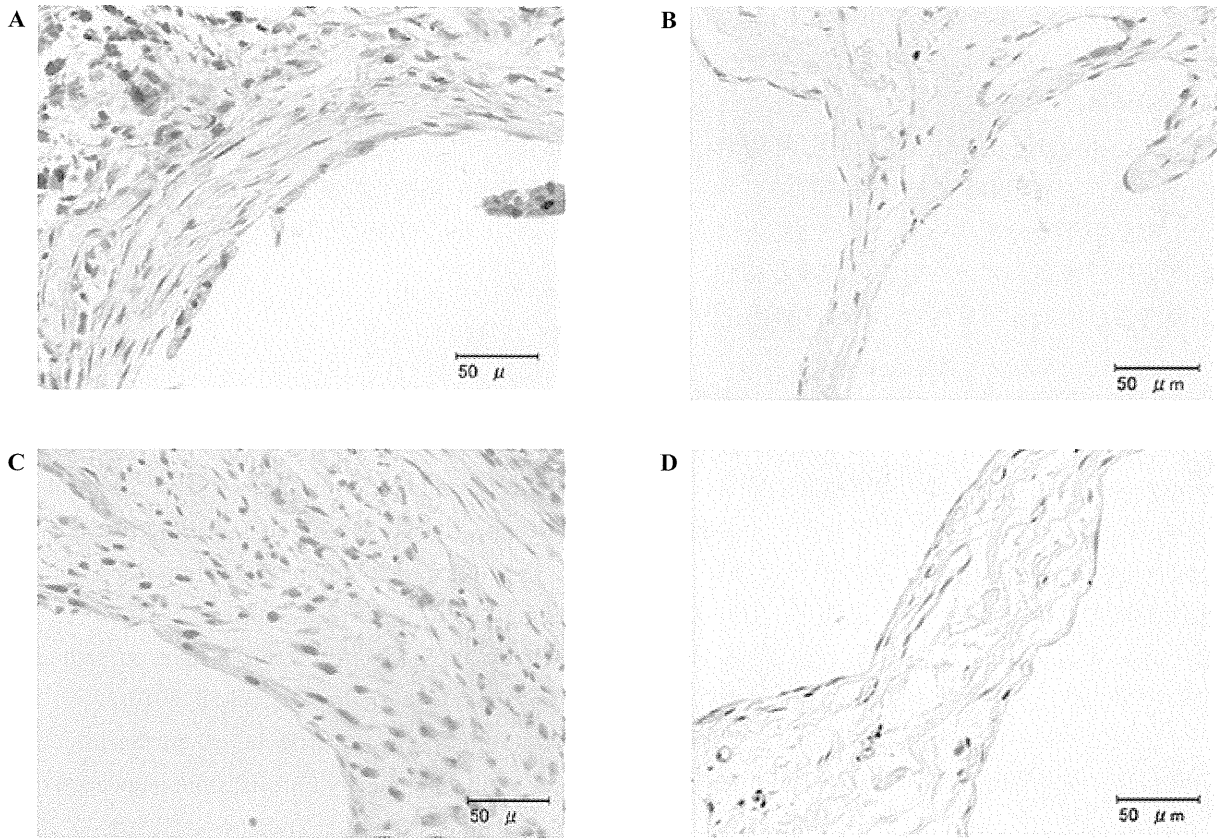


図4. 肺組織における p62 と ubiquitin 発現
 抗 p62 抗体染色 : A Fibroblastic Foci (IPF) B 蜂巣肺部位 (IPF)
 抗 ubiquitin 抗体染色 : C Fibroblastic Foci (IPF) D 蜂巣肺部位 (IPF)

(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下線維芽細胞に 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¹³⁾。本検討により、オートファジーの低下が筋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た。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- β -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- β 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¹²⁾。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、 β 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¹⁴⁾。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¹⁵⁾。ROS産生亢進は細胞老化¹⁶⁾、筋線維芽細胞分化¹⁷⁾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 NY 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

【平成25年度】

間質性肺炎がもたらす組織微小環境と 組織微小環境誘導上皮間葉移行に対する PTENリン酸化部位制御の重要性

橋本 直純 長谷川好規*

間質性肺炎は微小環境として線維化病変形成を直接促進する。PTENは新規にintrinsically disordered protein (IDP)と分類されてそのPTENC末端リン酸化部位がintrinsically disordered region (IDR)と同定された。組織微小環境がもたらすさまざまな上皮間葉移行(EMT)誘導刺激が、IDRであるPTENC末端部位リン酸化修飾をもたらしPTENの生理活性は減弱することを明らかにした。PTENC末端遺伝子変異を導入してPTENC末端側リン酸化部位制御をすることにより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の結果としてTGFβ誘導EMTを制御することを明らかにした。組織微小環境によるIDRであるPTENC末端側リン酸化部位修飾を詳細に解析することは、肺線維症における線維芽細胞とPTENを標的とする治療戦略上極めて有意義なものであると考えられた。

名古屋大学 大学院医学研究科 呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

A. 研究目的

微小環境を形成する上皮間葉移行(EMT)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。我々は、IDRであるPTENC末端リン酸化部位修飾による微小環境因子誘導EMTの機序を明らかにして、IDRであるPTENC末端リン酸化部位を治療標的とすることを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 肺胞上皮細胞を用いてTGFβ刺激および遷延化低酸素刺激によるPTEN発現, PTEN C末端リン酸化部位リン酸化, その表現型変化における影響を評価した。
- 2) 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, TGFβ刺激によるEMTを介した表現型変化を検討した。
- 3) これらの細胞株を用いて, TGFβ刺激によるβ-catenin細胞質内移行を免疫染色で評価した。

C. 結果

- 1) PTEN発現およびPTEN C末端リン酸化部位リン酸化におけるTGFβ刺激および遷延化低酸素刺激の影響

肺上皮細胞においてTGFβ刺激または, 遷延化低酸素刺激によりPTEN発現抑制とともにPTENリン酸化(p-PTEN)の亢進を認めた。その結果p-PTEN/PTEN ratioの有意な増加を認めた。

- 2) TGFβ誘導EMT表現型獲得におけるPTEN C末端リン酸化部位遺伝子変異による制御効果の検討の役割

TGFβ投与Dox非投与肺上皮細胞ではEMTを認めた。TGFβ投与Dox投与肺上皮細胞ではGFP-PTEN4A導入細胞株でのみ, EMT表現型誘導の抑制が認められた。

- 3) TGFβ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β-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TGFβ投与によってもβ-cateninは細胞膜に局在したままであった。

D. 考察と結論

我々は, 線維化病変から過剰産生されるTGFβ・遷延化低酸素刺激により, 肺上皮細胞は有意なPTEN発現抑制とPTEN C末端リン酸化亢進がもたらされることを明らかにした。これによってp-PTEN/PTEN ratio亢進が誘導されPTEN活性減弱がおこる。その結果TGFβ・遷延化低酸素誘導シグナルの活性化亢進がおこる状態になることを明らかにした。TGFβなど組織微小環境因子刺激はβ-cateninの細胞質内移行を誘導してEMT獲得に至るが, PTEN4Aは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。これらの結果よりIDRであるPTEN C末端リン酸化部位のリン酸化制御は極めて有用な治療標的となることが示唆された。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る。

E. 研究発表

1. Hashimoto, N. and Sakamoto, K., et al. 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.
2. Hashimoto, N. and Aoyama, D., et al. 2013. Involvement of TGFβ-induced phosphorylation of the PTEN C-terminus on TGFβ-induced acquisition of malignant phenotypes in lung cancer cells. *PLoS One*. 8(11):e81133.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

【平成25年度】

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^{1*}

【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

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¹³。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、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

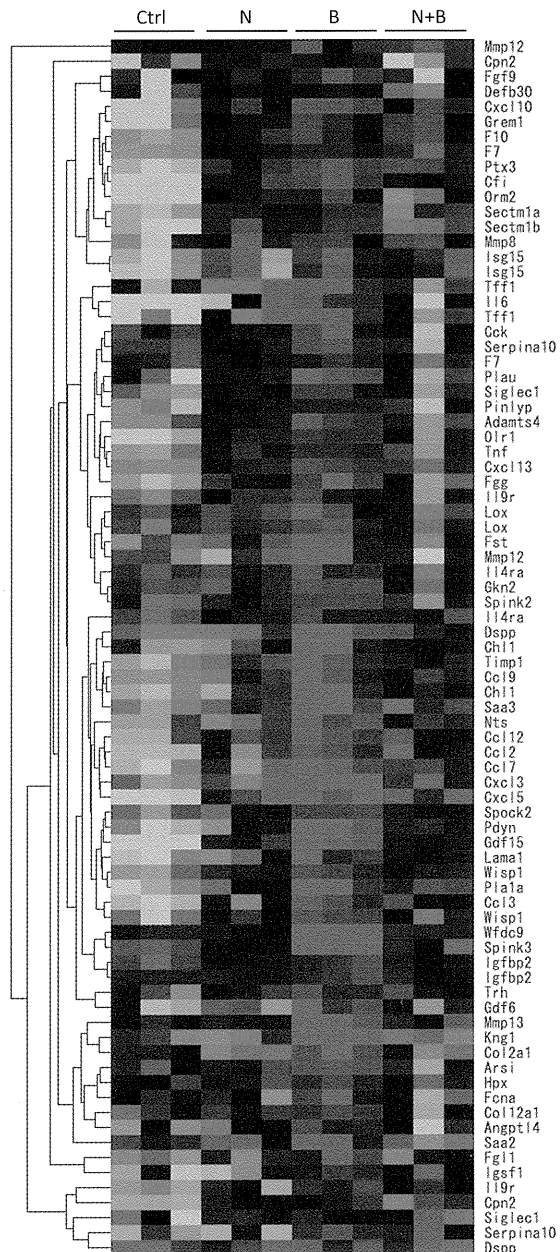


図1. The Gene expression microarray analysis of bronchiolar epithelial cells obtained by the laser microdissection method at d 16. N = naphthalene; B = bleomycin; N+B = bleomycin following naphthalene.

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い換えられるため、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。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

【平成 25 年度】

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¹⁾。

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わり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及を用いた。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

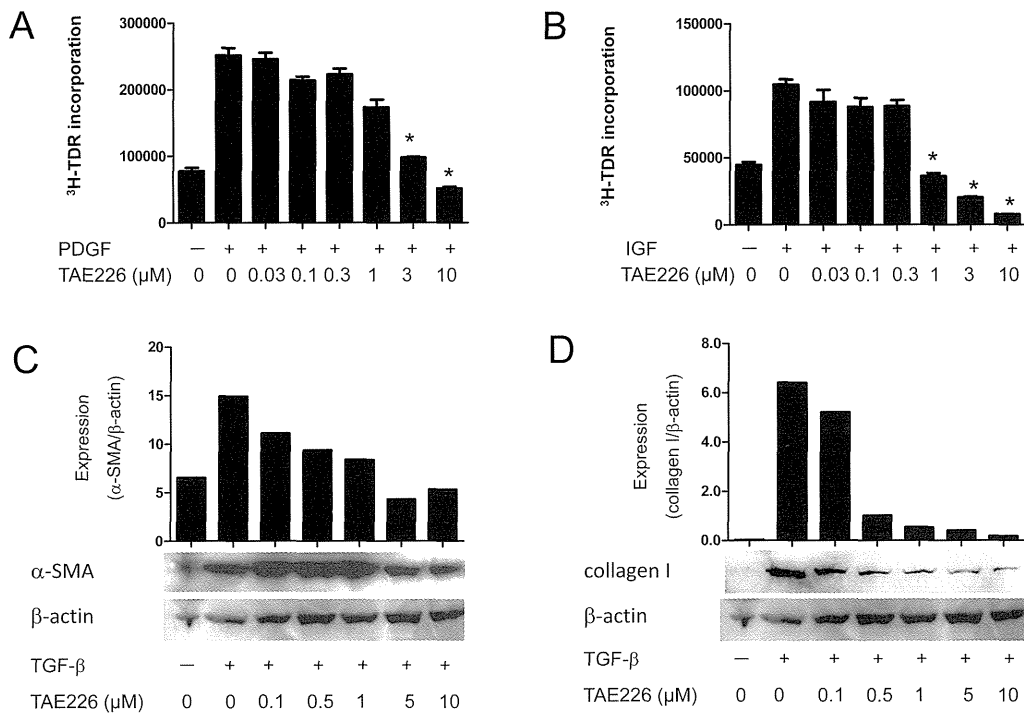


図1 TAE226による肺線維芽細胞増殖抑制効果及びα-SMA・collagen I発現抑制効果
 C57BL/6 マウス肺より樹立した線維芽細胞株を PDGF 10ng/ml(A)及び IGF-I(50ng/ml)(B)で刺激し、TAE226を加えた後48時間後に³H-チミジン取り込み試験を用いて肺線維芽細胞の増殖を評価した。IGF刺激下においてTAE226による増殖抑制効果はTAE226 1μMから認められた。またC57BL/6線維芽細胞をTGF-β 5ng/mlで刺激し、TAE226を加えた後24時間後にウェスタンブロット法を用いてα-SMA(C)及びcollagen I(D)の発現を評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

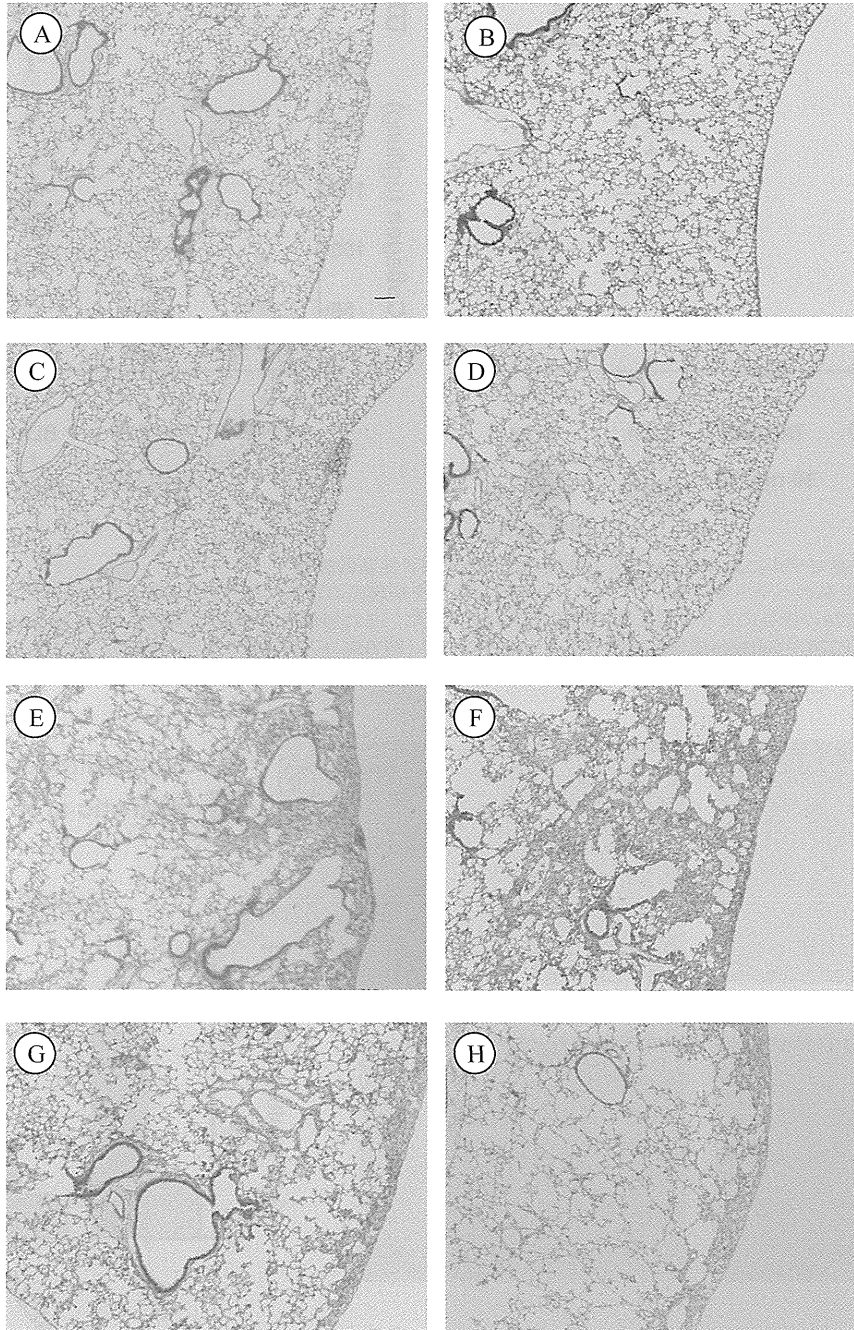


図2 BLM肺線維症モデルにおけるTAE226の肺線維化抑制効果
BLM肺線維症モデルマウスに対して15日目～28日目にTAE226(30mg/kg/日)を連日経口投与し、29日目に肺を摘出した後ヘマトキシリン・エオジン染色(A,C,E,G)及びマッソン・トリクローム染色(B,D,F,H)を用いて肺線維化を評価した。TAE226の投与により組織学的に肺線維化の抑制が確認された。A,B: saline, C,D:TAE226, E,F:BLM+saline, G,H:BLM+TAE226, (文献8より引用)

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

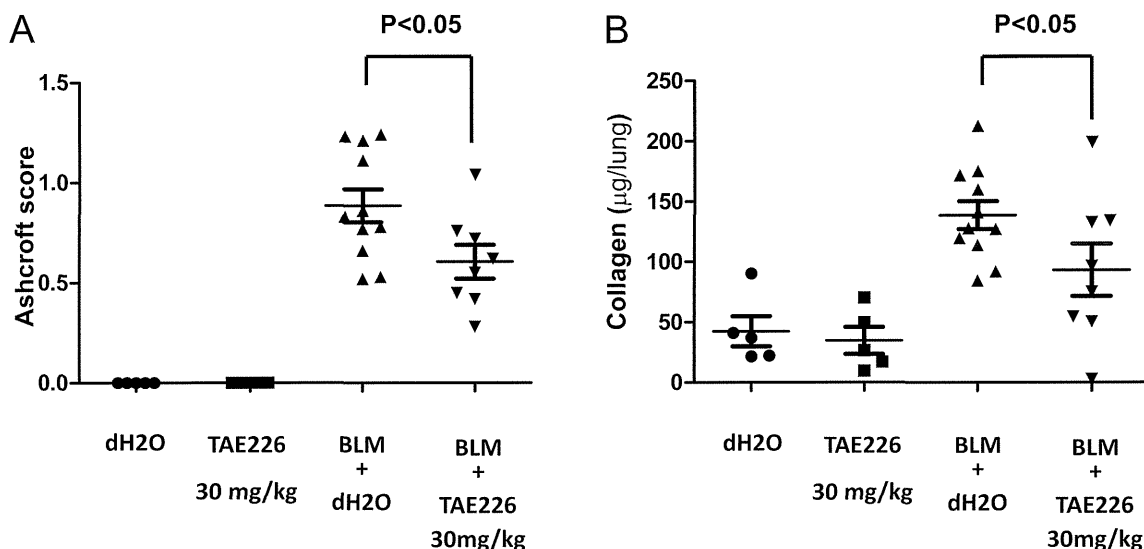


図3 BLM肺線維症モデルにおけるTAE226の肺線維化抑制効果の定量的評価
29日目に摘出した肺のヘマトキシリン・エオジン染色施行標本を病理医の評価に基づいてAshcroft Scoreによる数値化を行った(図3A). TAE226の投与により有意に肺の線維化が抑制された. また対側肺のSircol collagen assay kitを用いたcollagen定量を施行し, TAE226がcollagen産生も抑制することが示された(図3B). (文献8より引用)

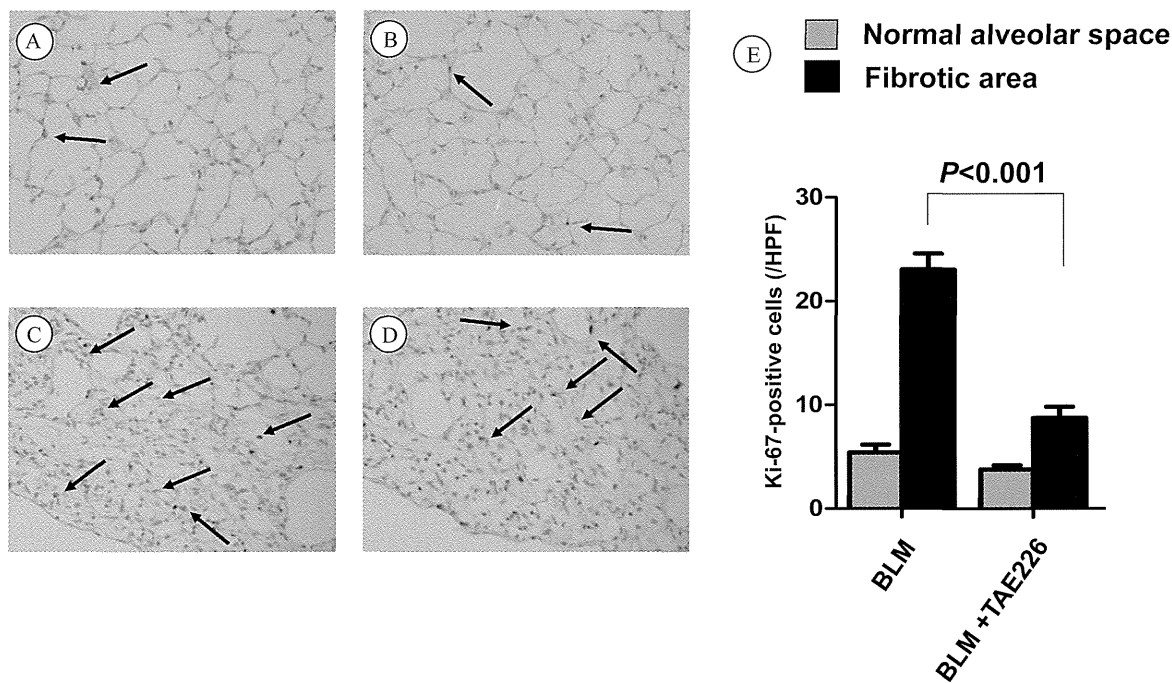


図4 BLM肺線維症モデルにおけるTAE226の肺線維芽細胞増殖抑制効果
BLM肺線維症モデルマウスに対して15日目～day28日目にTAE226(30mg/kg/日)を連日経口投与し, 29日目に肺を摘出した後, Ki67の免疫染色を行い陽性細胞数を検討した. TAE226の投与によりKi67陽性細胞は有意に減少していることが確認された. A: saline, B:TAE226, C:BLM+saline, D:BLM+TAE226, 矢印はKi67陽性細胞. (文献8より引用)

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⁸⁾。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

B. サルコイドーシス

【平成23年度】

北海道における臨床調査個人票に基づく サルコイドーシスの疫学調査

今野 哲¹ 四十坊典晴^{2*} 山口 哲生^{3*} 西村 正治^{1**}

臨床調査個人票を用い、2000～2008年度に北海道で新規診断されたサルコイドーシス患者1796人(組織診断群1085例, 61.7%)を対象に疫学調査をおこなった。男性637人, 女性1159人であり(男女比0.55), 年齢分布は二峰性を示した。眼, 皮膚病変は女性に多く, 肺野病変は男性に多かった。この期間において, 男女共に20歳代の割合が減少し, 女性では60歳代, 男性では50歳代の割合が増加していた。過去約10年間に於いて, サルコイドーシス患者の年齢は高齢化していることが示された。

Epidemiological survey of patients with sarcoidosis using clinical personal records in Hokkaido

Objective: The aim of this study was to investigate the recent change in the clinical characteristics of patients diagnosed with sarcoidosis in Hokkaido.

Methods: We retrospectively analyzed 1796 patients newly diagnosed with sarcoidosis between January 2000 and March 2009 based on the Japanese guidelines using a central database at the Ministry of Health, Labour and Welfare. We evaluated the change in clinical characteristics among several patients during this period.

Results: The male/female ratio was 0.55 and this remained unchanged during the study period. The prevalence of ocular and skin involvement was higher in females compared with males ($P < 0.001$), whereas the prevalence of lung parenchymal involvement was higher in males compared with females ($P < 0.001$). The age of onset increased during this period for both genders.

Conclusion: The age of onset of sarcoidosis in Hokkaido has recently increased and this phenomenon may affect the clinical course of the disease. Similar epidemiological surveys should be conducted in other Japanese areas. Further studies are required to clarify the change in the clinical course of sarcoidosis in Japan.

¹ 北海道大学大学院医学研究科呼吸器内科学分野

² JR札幌病院呼吸科内科

³ JR東京総合病院呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

** びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者