

FIGURE 2. 経気管投与後の肺組織 Real-time PCR Average \pm 1 SD n=5

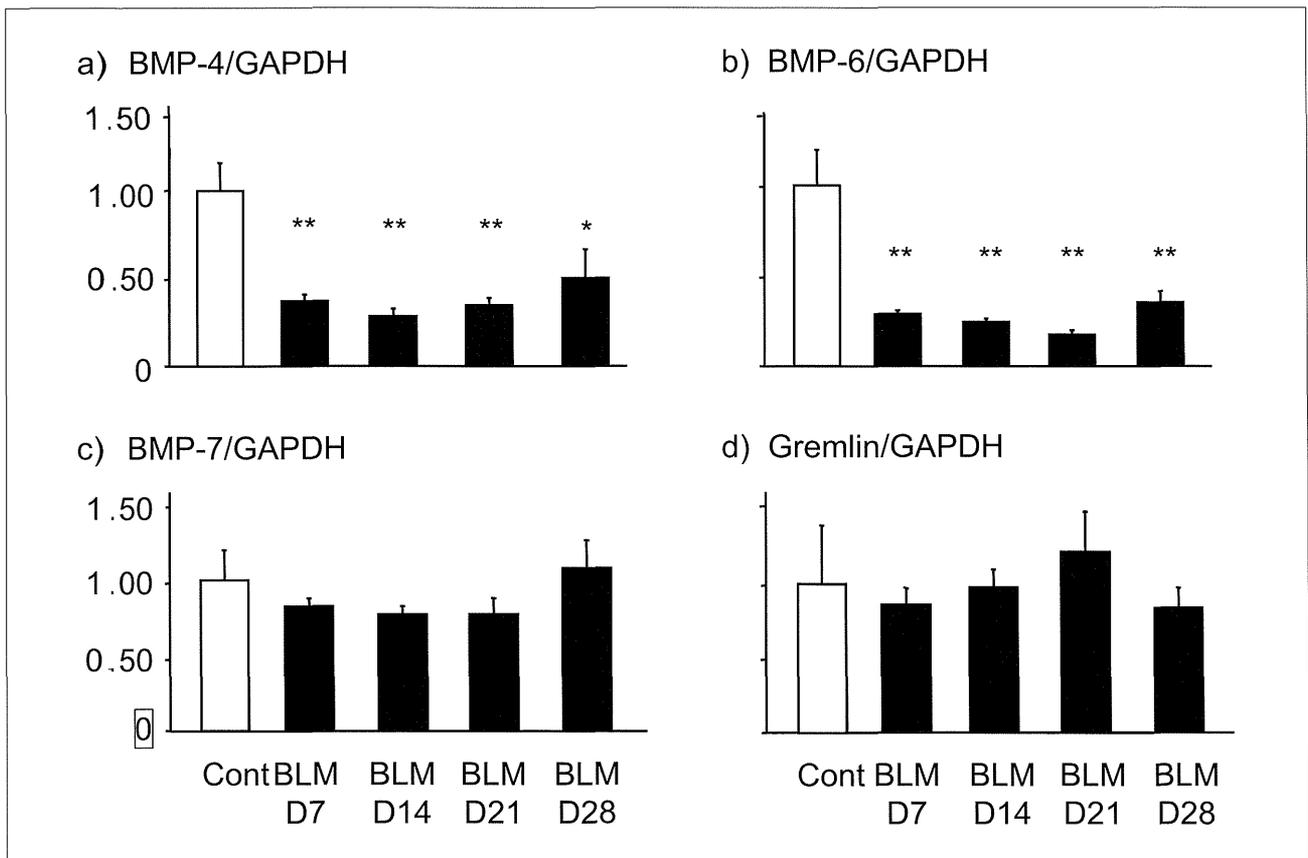


FIGURE 3. 経気管投与後の肺組織 Real-time PCR Average \pm 1 SD *P < 0.05 vs Cont **P < 0.01 vs Cont n=5

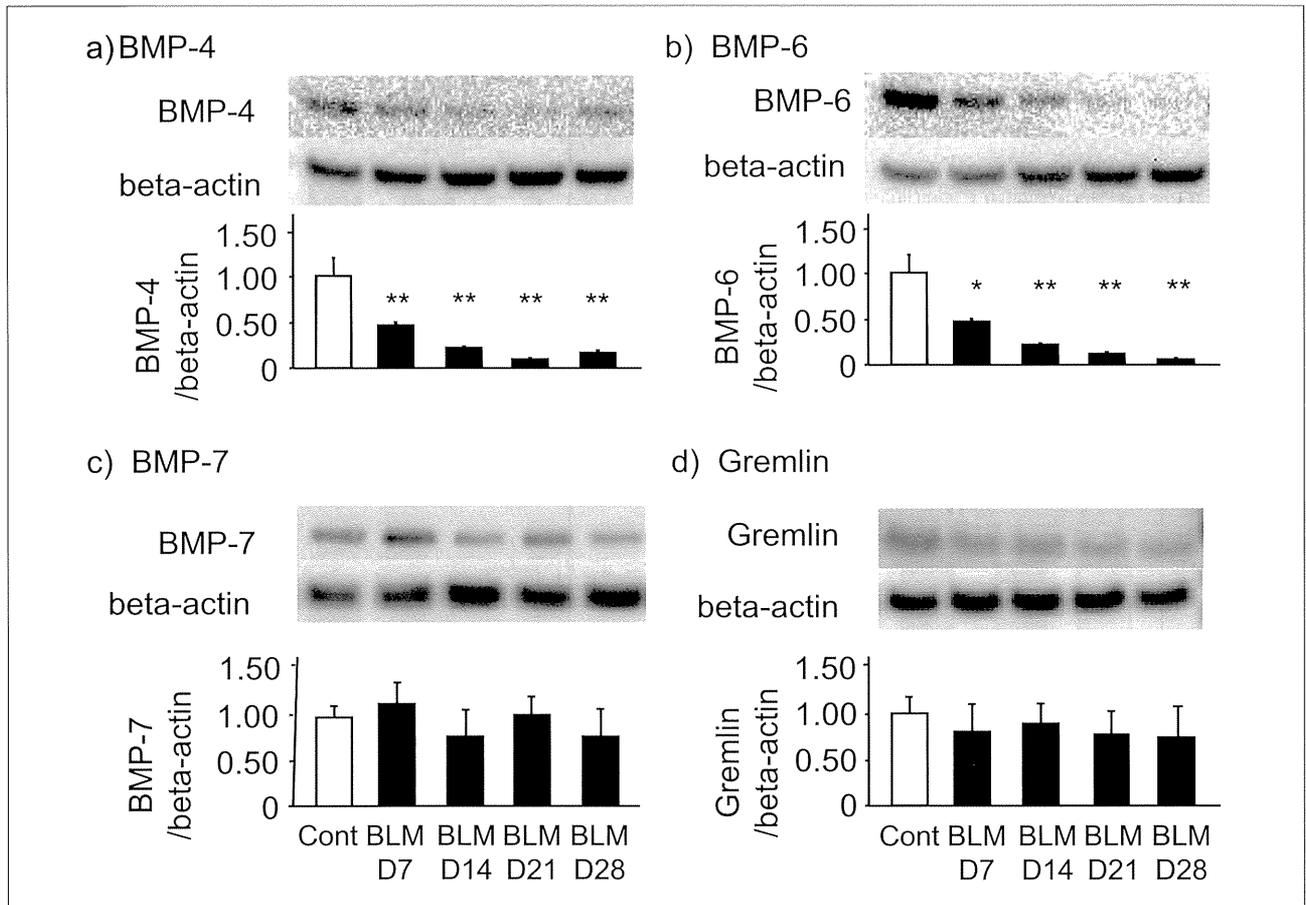


FIGURE 4. 経気管投与後の肺組織 Western blot Average \pm 1 SD * P < 0.05 vs Cont ** P < 0.01 vs Cont n=3

④ 経気道的に投与した BMP-4 の siRNA (siBMP-4) による肺組織の BMP-4 の mRNA 発現量 (FUGURE 5)

siBMP-4 気道投与により、BLM 投与後 21 日における肺組織内 BMP-4 mRNA 発現量低下と同程度の低下を認めた。

⑤ siBMP-4 経気道的投与による気道内炎症細胞の変化 (FUGURE 6、FUGURE 7)

siBMP-4 気道投与により、総細胞数、マクロファージ、好中球、リンパ球などが有意に増加しており、炎症細胞増加を認めた。

⑥ siBMP-4 経気道的投与による肺組織中炎症性サイトカイン mRNA 発現量の変化 (FUGURE 8)

Macrophage inflammatory protein-2 (MIP2) の有意な上昇を認めたが、Interleukin-1 β (IL-1 β)、Interleukin-6 (IL-6)、keratinocyte chemoattractant (KC) には有意な変化を認

めなかった。

⑦ siBMP-4 経気道的投与による組織所見の変化 (FUGURE 9)

siBMP-4 経気道的投与により炎症および肺の線維化所見を認めた。

⑧ siBMP-4 経気道的投与による肺組織中コラーゲン量の変化 (FUGURE 10)

左肺全体のコラーゲン量を定量しても、siBMP-4 経気道的投与により 21 日後にコラーゲン量の有意な上昇を認めた。

⑨ siBMP-4 経気道的投与による肺組織中線維化因子の mRNA 発現量の変化 (FUGURE 11)

siBMP-4 経気道的投与により、COL1A1 や fibronectin の mRNA 発現増強を認めた。

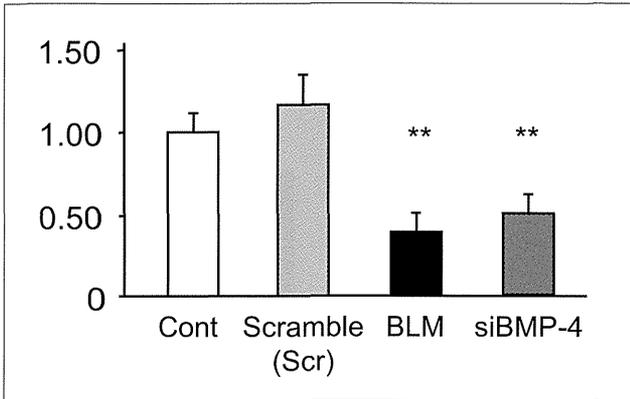


FIGURE 5. 経気管投与 21 日目の肺組織 BMP-4/GAPDH Real-time PCR
Average \pm 1 SD n=5 **P < 0.01 vs Cont

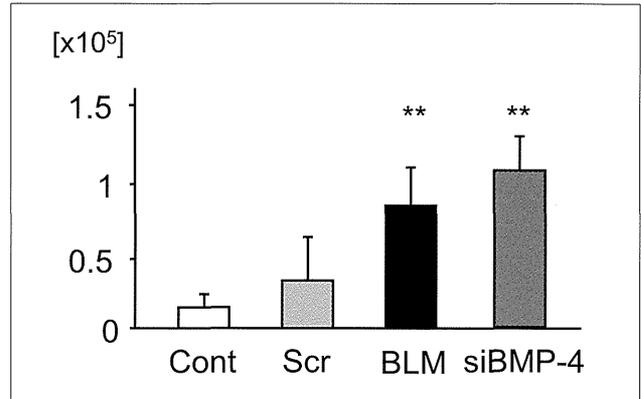


FIGURE 6. 経気管投与 21 日目の BALF 中総細胞数
Average \pm 1 SD n=5 **P < 0.01 vs Cont

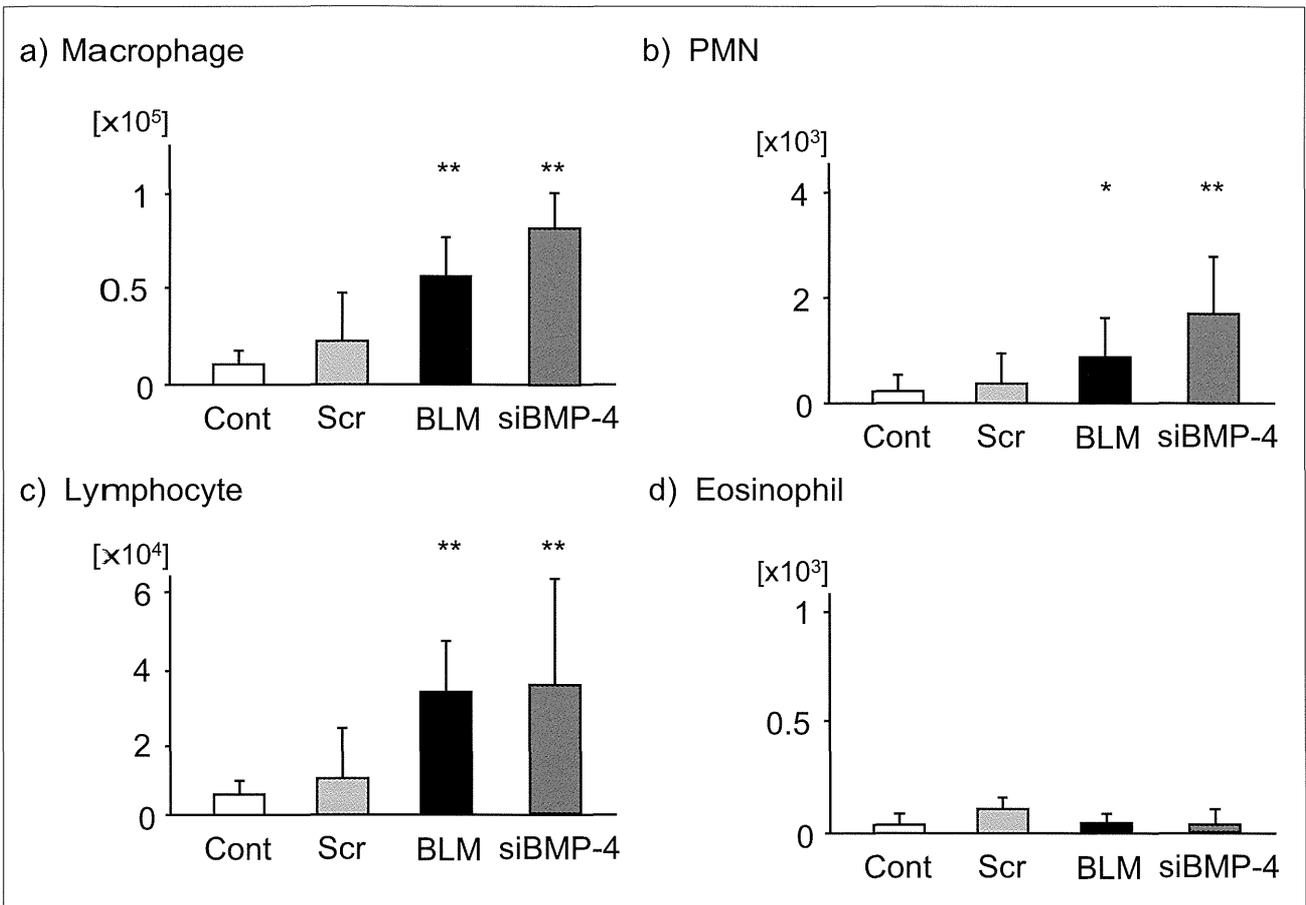


FIGURE 7. 経気管投与 21 日目の BALF 中における各分画細胞数
Average \pm 1 SD n=5 * P < 0.05 vs Cont ** P < 0.01 vs Cont

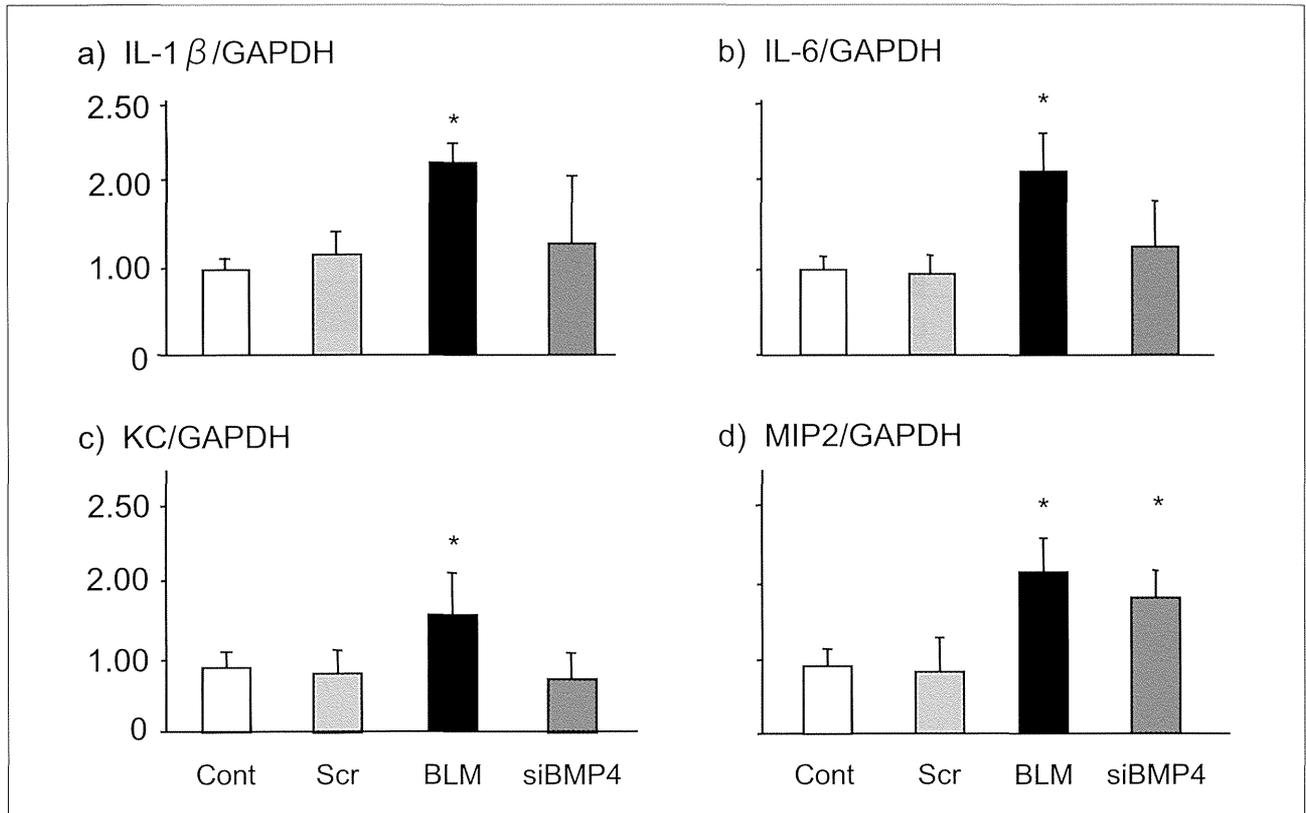


FIGURE 8. 経気管投与 21 日目の肺組織 Real-time PCR Average \pm 1 SD *P < 0.05 vs Control n=5

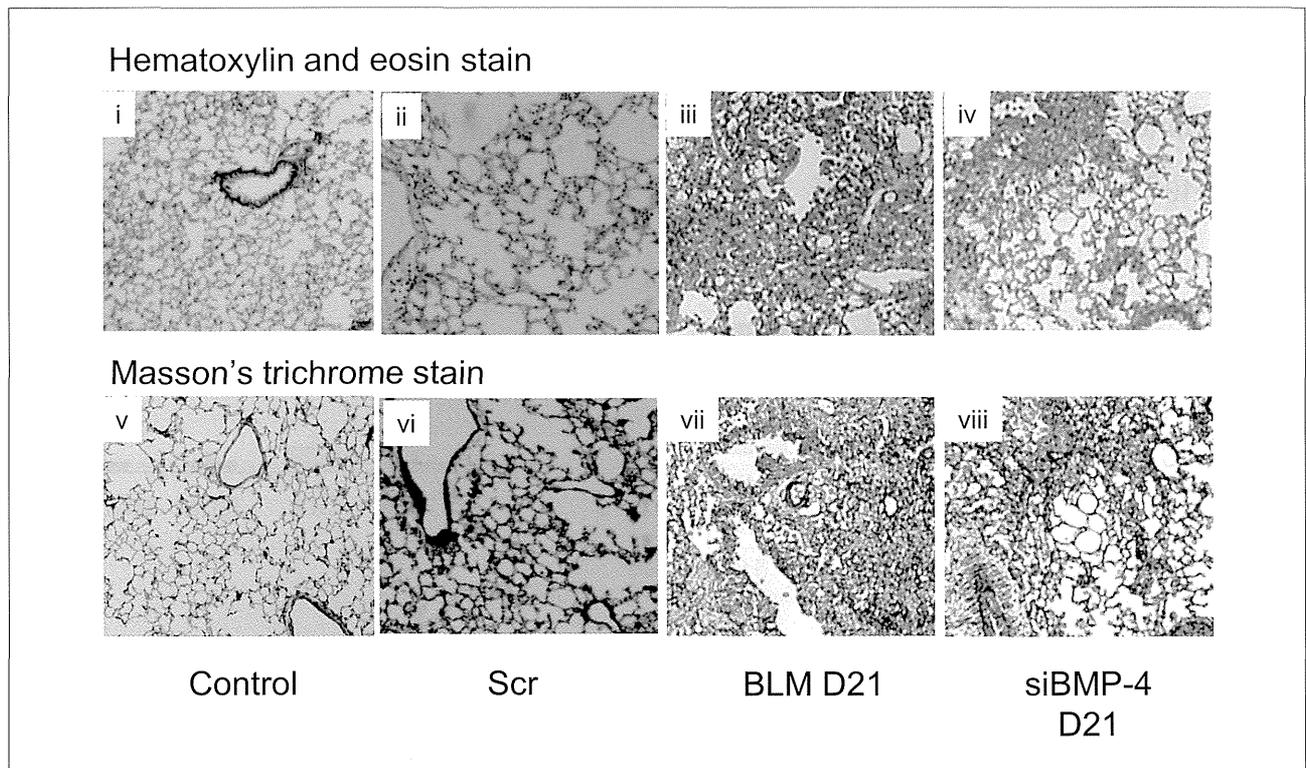


FIGURE 9. 経気管投与 21 日目の Pathological findings

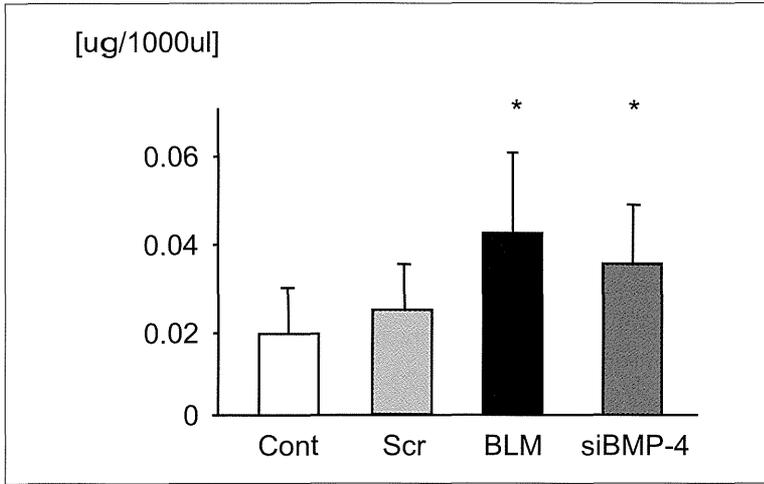


FIGURE 10. 経気管投与後の肺組織 Collagen content

Average \pm 1 SD
*P < 0.05 vs Control
n=5

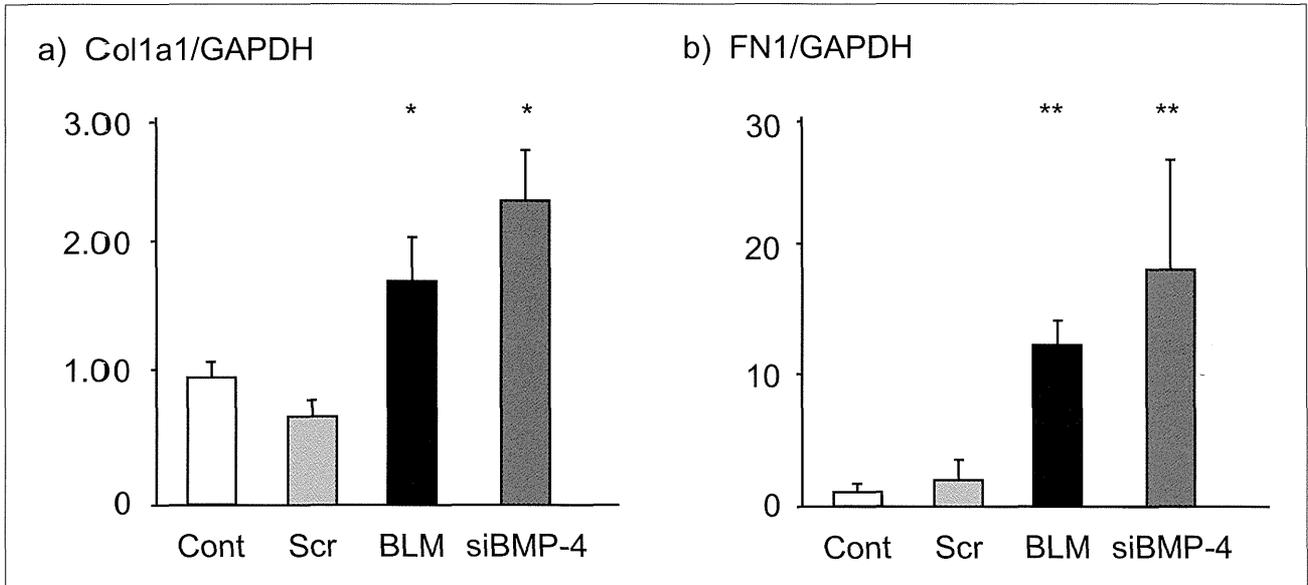


FIGURE 11. 経気管投与 21 日目の肺組織 Real-time PCR
Average \pm 1 SD *P < 0.05 vs Control **P < 0.01 vs Control n=5

D. 考察

腎で BMP-7 が線維化に関与すると報告されているが (9)、肺では否定的な報告がある (10)。今回の検討でも、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 の上昇を認めしたが (5)、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 は肺線維化モデル次第で関与が異なり、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。BMP-4 は肺局所の炎症に関わる可能性があり、炎症性サイトカインである MIP2 の抑制に関与し、炎症細胞集積に対し抑制的に作用する可能性がある。また、BMP-4 の持続的な抑制により肺の線維化にも関与する可能性がある。今後は抗炎症効果や抗線維化作用に関する詳細な検討が必要であり、TGF- β の作用への関与の解析が必要である。また、今回十分な検討ができなかった BMP-6 の関与に関する詳細な検討を要する。さらに、recombinant BMPs を用いた治療効果の検討が望まれる。

E. 結論

肺の発達に参与する BMP-4 は局所の炎症と線維化に抑制的に参与する可能性が示唆された。

F. 参考文献

1. Okada H. Tolloid-like proteinases orchestrate extracellular matrix formation. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:588-589.
2. Takabayashi H, Shinohara M, Mao M, Phaosawasdi P, El-Zaatari M, Zhang M, Ji T, Eaton KA, Dang D, Kao J, Todisco A. Anti-inflammatory activity of bone morphogenetic protein signaling pathways in stomachs of mice. *Gastroenterology* 2014;147:396-406 e397.
3. Xiao Y, Yu S, Zhu B, Bedoret D, Bu X, Francisco LM, Hua P, Duke-Cohan JS, Umetsu DT, Sharpe AH, Dekruyff RH, Freeman GJ. Rgmb is a novel binding partner for pd-l2 and its engagement with pd-l2 promotes respiratory tolerance. *J Exp Med* 2014;211:943-959.
4. Stumm CL, Halcsik E, Landgraf RG, Camara NO, Sogayar MC, Jancar S. Lung remodeling in a mouse model of asthma involves a balance between tgf-beta1 and bmp-7. *PLoS One* 2014;9:e95959.
5. 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.
6. Pegorier S, Campbell GA, Kay AB, Lloyd CM. Bone morphogenetic protein (bmp) -4 and bmp-7 regulate differentially transforming growth factor (tgf) -beta1 in normal human lung fibroblasts (nhlf) . *Respir Res* 2010;11:85.
7. Myllarniemi M, Vuorinen K, Pulkkinen V, Kankaanranta H, Aine T, Salmenkivi K, Keski-Oja J, Koli K, Kinnula V. Gremlin localization and expression levels partially differentiate idiopathic interstitial pneumonia severity and subtype. *J Pathol* 2008;214:456-463.
8. Hackett TL, Warner SM, Stefanowicz D, Shaheen F, Pechkovsky DV, Murray LA, Argentieri R, Kicic A, Stick SM, Bai TR, Knight DA. Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:122-133.
9. 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.
10. 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.

リウマチ肺の気管支肺胞洗淨液における プロテオミクス解析に関する研究

須原 宏造、宮崎 泰成、岡本 師、稲瀬 直彦

研究要旨

【背景】 関節リウマチ (RA) は 10 ~ 30% に間質性肺疾患を合併し、RA 患者の 10% は間質性肺疾患が死亡に関与していると報告されている。RA の間質性肺疾患には遺伝学的要因、血清学的要因、環境要因など様々な因子が関与していると考えられているが、そのメカニズムは明らかになってはいない。

【目的】 気管支肺胞洗淨液 (BALF) を用いて RA の肺線維化に関わる蛋白を明らかにする。

【方法】 2001 年 ~ 2011 年に当院で RA と診断されて間質性肺炎を合併した患者を対象とした。胸部 HRCT にて UIP パターンを呈した 5 例 (UIP 群)、OP パターンを呈した 7 例 (OP 群) に分類した。BALF を用いて 2 次元電気泳動、SYPRO Ruby 染色後、画像解析ソフトを用いて各 spot を比較解析した。発現量に差を認めた spot について質量分析、データベース検索により同定した。

【結果】 UIP 群で有意に発現が高い spot は、ゲルゾリンと免疫グロブリンカッパ鎖 C 領域であった。一方、OP 群で有意に発現が高い spot は、 α 1-アンチトリプトシン、CRP、ハプトグロビン、SP-A (isoform number 5) であった。ゲルゾリンは細胞内で caspase-3 により C 末端ゲルソリンと N 末端ゲルソリンに切断されるが、本研究で同定したゲルゾリンは切断された C 末端ゲルゾリンであった。UIP 群では C 末端ゲルゾリンと N 末端ゲルゾリンともに発現が高かった。UIP 群の肺組織の免疫染色において C 末端ゲルゾリンは fibroblast に発現しており、N 末端ゲルゾリンは線毛上皮化生に発現していた。

【結論】 リウマチ肺の UIP パターンと OP パターンにおいて発現量の異なる蛋白が明らかにされた。リウマチ肺において C 末端ゲルゾリンと N 末端ゲルゾリンは肺線維化に関わる可能性が示唆された。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は 10 ~ 30% に間質性肺疾患 (interstitial lung disease: ILD) を合併し、RA 患者の 10% は ILD が死亡に関与している。関節リウマチの間質性肺疾患 (RA-ILD) における病理組織学的パターンは usual interstitial pneumonia (UIP) と nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) が多く、organizing pneumonia (OP) と lymphocytic interstitial pneumonia (LIP) は少ない。UIP パターンは OP パターンより予後が悪いことが報告され

ている。^{2,3} RA-ILD には遺伝学的要因、血清学的要因、環境要因など様々な因子が関与していると考えられているが、そのメカニズムは明らかになってはいない。

ゲルゾリンはアクチン結合タンパク質の一つであり、アクチンの切断や重合を制御することで、細胞形態や細胞代謝を調整している。⁴ ゲルゾリンは caspase や matrix metalloproteinase (MMP) によって中央部で切断されることが知られている。^{5,6} Caspase-3 はアポトーシスの重要なエフェクター

であるが、ゲルゾリンを C 末端ゲルゾリン (C-ゲルゾリン) と N 末端ゲルゾリン (N-ゲルゾリン) に切断する。⁷ C-ゲルゾリンは抗アポトーシス作用があり、N-ゲルゾリンはアポトーシス作用があるとされている。⁴

最近の研究では、IPF と fibrotic NSIP の患者においてゲルゾリンの発現が増加することが報告されている。またブレオマイシン肺線維症モデル(マウス)において、ゲルゾリンが好中球の浸潤や上皮のアポトーシスに関与していることが示唆されている。⁸ ゲルゾリンは RA にも関与していることが示唆されている。関節リウマチモデルマウスにおいて滑膜線維芽細胞のゲルゾリンをノックアウトすると、RA の発症が促進され病勢が増悪する。⁹ また RA 患者において、血清中のゲルゾリンは減少し滑膜液中にゲルゾリンとアクチンの複合体が形成されることから、RA 患者の関節においてゲルゾリンが局所的に消費されると考えられている。¹⁰

今回我々は、UIP パターンと OP パターンを呈した RA-ILD の気管支肺胞洗浄液 (BALF) のプロテオミクス解析をすることで、RA-ILD の線維化に関わる蛋白を明らかにすることを試みた。また UIP パターンで発現が増加していたゲルゾリンに注目し、ゲルゾリンと RA-ILD の関係について検討した。

B. 研究方法

1. 対象

2001 年～ 2011 年に当院で RA と診断されて間質性肺炎を合併した未治療の患者を対象とした。胸部 HRCT で UIP パターンを呈した 5 例 (UIP 群)、OP パターンを呈した 7 例 (OP 群) に分類した。

2. 2次元電気泳動・質量分析

過去に報告されている方法と同様の方法で施行した。¹¹ ①気管支肺胞洗浄液検体を用いて、一次元目に IPG-IEF、二次元目に SDS-PAGE を行い、二次元にタンパク質を展開。②染色；SYPRO Ruby 染色③ゲル内消化；バンドノスポットの切り出しから peptide の溶出、濃縮、脱塩。トリプ

シンをゲル内に浸透させ (膨潤)、この後トリプシン溶液を除き (脱水)、脱色するまで繰り返す。④蛋白の同定；質量分析。マトリックス支援レーザー脱イオン化 / 飛行時間型質量分析 (Matrix-assisted Laser desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; MALDI TOF MS) などを用いる。⑤データベース検索；SWISS-2D PAGE human plasma map と published BALF maps により同定。

3. western blot

BALF・血清を SDS-PAGE ゲルまたは 2-DE-PAGE ゲルに展開し PVDF 膜に転写。メンブレンをスキムミルクでブロッキングした後、1 次抗体として抗 C 末端ゲルゾリン抗体 (C-20; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) と抗 N 末端ゲルゾリン抗体 (ab75832; Abcam, Cambridge, MA) を用いてそれぞれ抗原抗体反応を施行。2 次抗体として Cy3 標識抗ヤギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; 705-545-147) または Cy3 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; 111-165-003) を使用。ChemiDoc MP (Bio-rad laboratories, Tokyo, Japan) で撮影、検出。

4. ELISA

ゲルゾリンの ELISA キット (Aviscera Bioscience, Inc. Santa Clara, CA, USA) を使用した。症例数を増やし、血清 14 検体 (UIP パターン 8 例、OP パターン 6 例)、BALF14 検体 (UIP パターン 6 例、OP パターン 8 例) で検討した。血清は 5,000 倍に希釈し、BALF は 3 倍に希釈して測定した。

5. 免疫組織学的染色

免疫組織学的染色としては色素として DAB を用い、1 次抗体としては抗 C 末端ゲルゾリン抗体 (ab74420; Abcam, Cambridge, MA) と抗 N 末端ゲルゾリン抗体 (ab75832; Abcam, Cambridge, MA) を用いた。

(倫理面への配慮)

保存してある気管支肺胞洗浄液約 1.5ml、血清 1ml を用いた。気管支肺胞洗浄液と血清は通常の診療の一環として使用した検体の一部を使用し

た。気管支肺胞洗浄液と血清は連結可能匿名化の状態にして保管し、そこから診療情報を収集した。また過去に外科的肺生検を受けた患者については、残っている病理組織を使用した。上記内容を当大学倫理審査委員会に計画書として提出し、承認を受けた(承認番号 1270)。

C. 研究結果

1. 患者背景

血清 CRP は OP 群が UIP 群より有意に増加していた。血清 KL-6 と血清 LDH は UIP 群が OP 群より有意に増加していた。BALF 所見は両群で差はなかった(表 1)。

2. 2次元電気泳動

UIP 群、OP 群の BALF の 2次元電気泳動の結果を図 1 に示す。質量分析とデータベース検索によって 38 個のスポットが明らかになった(表 2)。ゲルゾリンと免疫グロブリンカッパ鎖 C 領域は

UIP 群が OP 群より有意に増加していた(表 3)。 α 1-アンチトリプトシン、CRP、ハプトグロビン、SP-A (isoform number 5) は OP 群が UIP 群より有意に増加していた(表 4)。

3. ゲルゾリンの同定

ゲルゾリンは caspase や MMP によって中央部で切断され、C-ゲルゾリンと N-ゲルゾリンになることが知られている。本研究で同定したゲルゾリンは分子量が本来の約半分程度であり、切断されたゲルゾリンであった。質量分析で同定されたゲルゾリンのペプチドは C 末端側に位置しており、同定したゲルゾリンは C 末端ゲルゾリンであると考えられた(図 2A)。また C-ゲルゾリンのみを認識する抗ゲルゾリン抗体を使用して western blot を施行したところ、同定したゲルゾリンに反応が見られた(図 2B)。

4. ゲルゾリンの測定

個々の BALF、血清検体について western blot

表 1 患者背景

特徴	UIP (n = 5)	OP (n = 7)	p 値
性別			
男	4	3	
女	1	4	0.293
年齢(歳)	62 (54 - 68)	69 (54 - 73)	0.569
喫煙歴 (Pack - year)	33 (28 - 43)	5 (0 - 40)	0.224
血清 CRP (mg/dl)	0.8 (0.3 - 1.2)	12.0 (8.0 - 14.0)	0.007 **
血清 LDH (IU/l)	236 (201 - 298)	182 (179 - 194)	0.042 *
血清 KL-6 (U/ml)	1500 (904 - 1945)	212 (130 - 359)	0.004 **
血清 SP-D (ng/ml)	132 (80 - 216)	40 (25 - 72)	0.056
%VC (%)	83.4 (80.9 - 99.1)	88.2 (71.7 - 92.9)	0.905
%FEV _{1.0} (%)	76.4 (73.5 - 92.5)	83.6 (59.9 - 86.8)	0.905
BALF			
回収率 (%)	47.3 (32.0 - 61.7)	46.0 (44.0 - 54.7)	1.000
細胞密度 ($\times 10^5$ /ml)	2.4 (1.9 - 4.7)	4.5 (3.5 - 5.3)	0.268
マクロファージ (%)	61.0 (56.9 - 82.6)	83.2 (67.6 - 93.4)	0.268
リンパ球 (%)	28.8 (12.3 - 40.9)	6.5 (5.2 - 11.3)	0.106
好中球 (%)	2.6 (1.3 - 6.1)	4.6 (2.1 - 15.3)	0.569
好酸球 (%)	0.9 (0.3 - 3.6)	0.6 (0.0 - 2.5)	0.566
CD4/CD8	3.9 (1.0 - 6.7)	1.5 (1.0 - 3.0)	0.527

* p < 0.05, ** p < 0.01

数値は中央値 (25、75 パーセントイル値)

UIP, usual interstitial pneumonia; OP, organizing pneumonia; KL-6, Krebs von den Lungen 6; SP-D, surfactant protein D; %VC, percentage of predicted vital capacity; %FEV_{1.0}, percentage of forced expiratory volume in one second

表 2 2 次元電気泳動で同定した BALF 中のタンパク質

No.	タンパク質	AC	同定方法
1	α -2 macroglobulin	P-01023	GM ^b
2	Ceruloplasmin	P-00450	GM, MS ^c
3	Immunoglobulin A-S chain	P-99003	GM, MS
4	Complement factor B	P-00751	GM
5	α -1 B-glycoprotein	P-04217	GM, MS
6	Hemopexin	P-02790	GM, MS
7	Albumin	P-02768	GM, MS
8	Transferrin	P-02787	GM, MS
9	Complement C3 β	P-01024	GM
10	Immunoglobulin heavy chain α	P-99002	GM, MS
11	α -2 antiplasmin	P-08697	GM, MS
12	α -1 antichymotrypsin	P-01011	GM, MS
13	α -2-HS-glycoprotein	P-02765	GM, MS
14	Antithrombin III	P-01008	GM, MS
15	Vitamin D-binding protein	P-02774	GM, MS
16	α -1 antitrypsin	P-01009	GM, MS
17	Zinc finger protein GLIS1	P-08151	MS
18	Apolipoprotein A-IV	P-06727	GM
19	Gelsolin	P-06396	MS
20	β -actin	P-60709	GM, MS
21	Fibrinogen γ , α chain	P-02679	GM
22	Immunoglobulin heavy chain μ	P-99009	GM, MS
23	Immunoglobulin heavy chain γ	P-99006	GM
24	Zinc α -2-glycoprotein	P-25311	GM
25	Haptoglobin β	P-00737	GM, MS
26	Toll-like receptor 1	P-38593	MS
27	Pulmonary surfactant protein A	P-07714	GM, MS
28	Immunoglobulin J chain	P-01591	GM, MS
29	Complement factor I	P-05156	GM
30	Immunoglobulin kappa chain C region	P-01834	MS
31	C-reactive protein	P-02741	GM, MS
32	Proapolipoprotein AI	P-39133	GM
33	Immunoglobulin light chain κ , λ	P-99007	GM
34	Apolipoprotein A-1	P-02647	GM
35	Glutathione S-transferase pi	P-09211	GM, MS
36	Translationally controlled tumor protein	P-13693	GM
37	Serum retinol binding protein	P-02753	GM
38	Haptoglobin α	P-00738	GM

No.: 図 1 の注釈を参照 .

AC, SWISS-PROT データベースのアクセッション番号 ; GM, SWISS-PROT データベースの 2 次元電気泳動ゲルとのゲルマッチング ; MS, LC-nESI-MS/MS

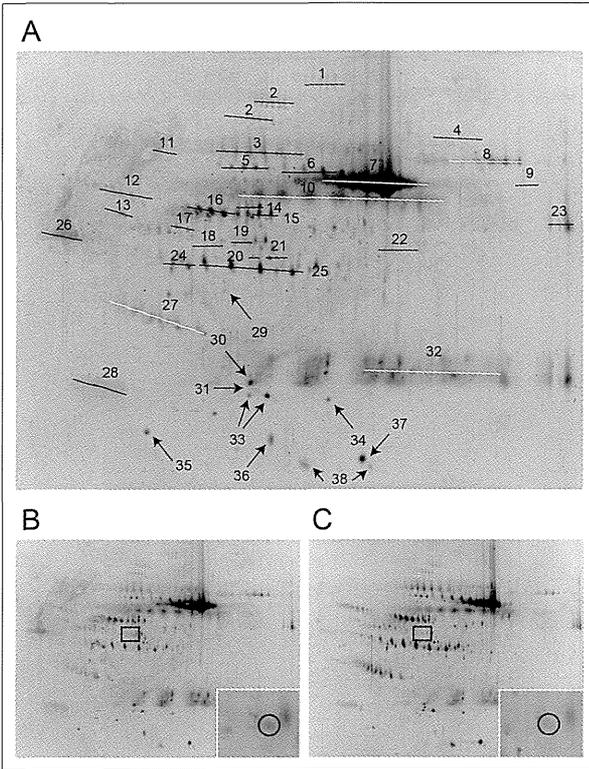


図1 UIP群とOP群における2次元電気泳動
 (A) UIP群のRA-ILD患者におけるBALFの2次元電気泳動。図中の数字は質量分析またはゲルマッチングによって同定したタンパクであり、詳細は表2に記載。(B) UIP群の患者のBALFの2次元電気泳動。(C) OP群の患者の2次元電気泳動。四角で囲った領域を右下に拡大して表示してある。丸で囲まれたスポットは質量分析で同定されたゲルズリンである。

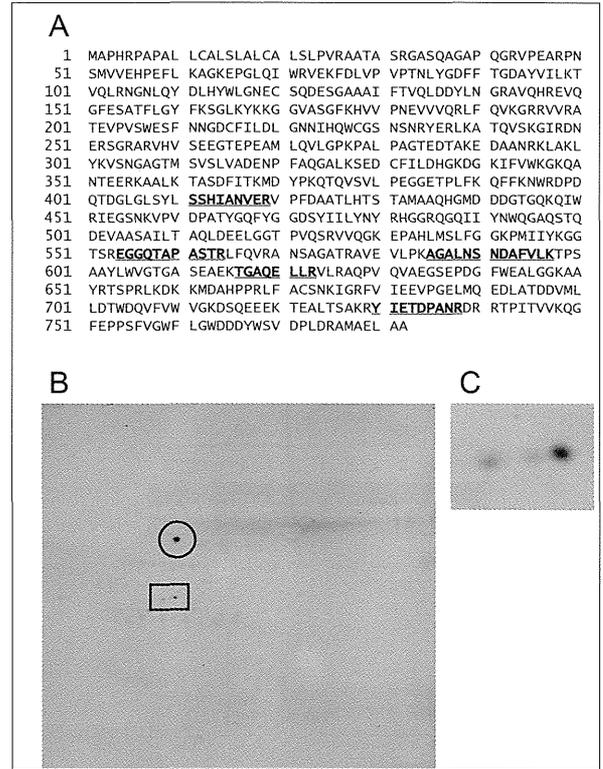


図2 質量分析とウェスタンブロッティングによるゲルズリンの同定
 (A) ヒトのゲルズリンのアミノ酸シーケンスであり、下線・太字になっている部位は質量分析で検出されたペプチド。C末端側のペプチドのみ検出されている。(B) UIP群のBALFのウェスタンブロッティングの結果。1次抗体としてC末端側のゲルズリンのみ認識する抗体を使用。丸で囲まれた領域は非特異的反応。四角で囲まれた領域は(C)で拡大表示している。(C) ウェスタンブロッティングで反応したスポット。

表3 UIP群で発現が増加していたタンパク質

タンパク質	理論上のMW (kDa) / pI	UIP群のノーマライゼーションボリューム (× 10 ⁻³)	OP群のノーマライゼーションボリューム (× 10 ⁻³)	p値
免疫グロブリン	11.6 / 5.6	540.0 (376.5 - 800.5)	187.5 (96.3 - 268.3)	0.011
カッパ鎖C領域				
ゲルズリン	41.3 / 5.0	64.0 (57.5 - 94.5)	27.0 (13.0 - 39.5)	0.034

数値は中央値 (25、75パーセンタイル値)
 UIP, usual interstitial pneumonia; OP, organizing pneumonia

表4 OP群で発現が増加していたタンパク質

タンパク質	理論上のMW (kDa) / pI	UIP群のノーマライゼーションボリューム (× 10 ⁻³)	OP群のノーマライゼーションボリューム (× 10 ⁻³)	p値
α-1アンチトリプシン	46.7 / 5.4	0 (0 - 26.5)	74.5 (31.3 - 94.3)	0.026
CRP	25.0 / 5.5	0 (0 - 0.023)	145.0 (106.0 - 161.5)	0.034
ハプトグロビン	45.2 / 6.1	106.0 (42.5 - 291.5)	353.0 (312.5 - 771.8)	0.006
SP-A (isoform number 5)	26.2 / 5.1	95.0 (58.0 - 217.5)	480.0 (192.5 - 964.5)	0.019

数値は中央値 (25、75パーセンタイル値)
 UIP, usual interstitial pneumonia; OP, organizing pneumonia, Ig, Immunoglobulin

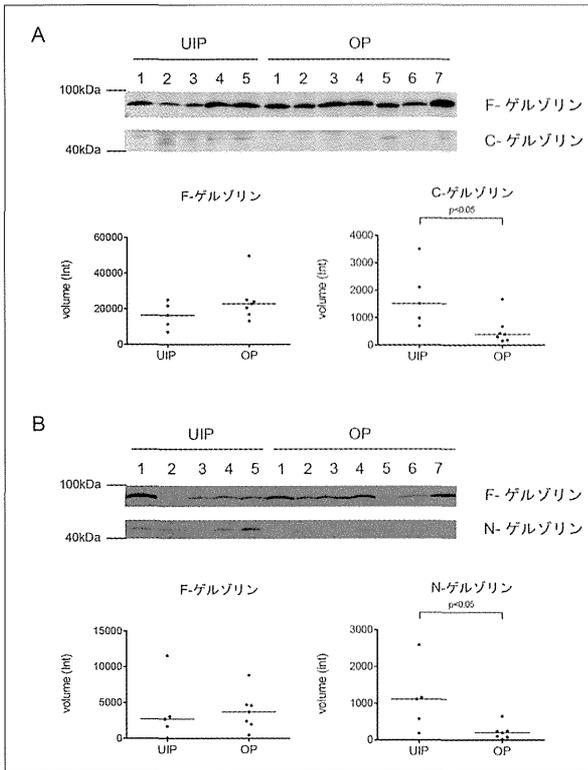


図 3 BALF のウェスタンブロッティング
 (A) C-ゲルゾリンは UIP 群が OP 群より増加していた。F-ゲルゾリンは両群間で差がなかった。(B) N-ゲルゾリンは UIP 群が OP 群より増加していた。F-ゲルゾリンは両群間で差がなかった。

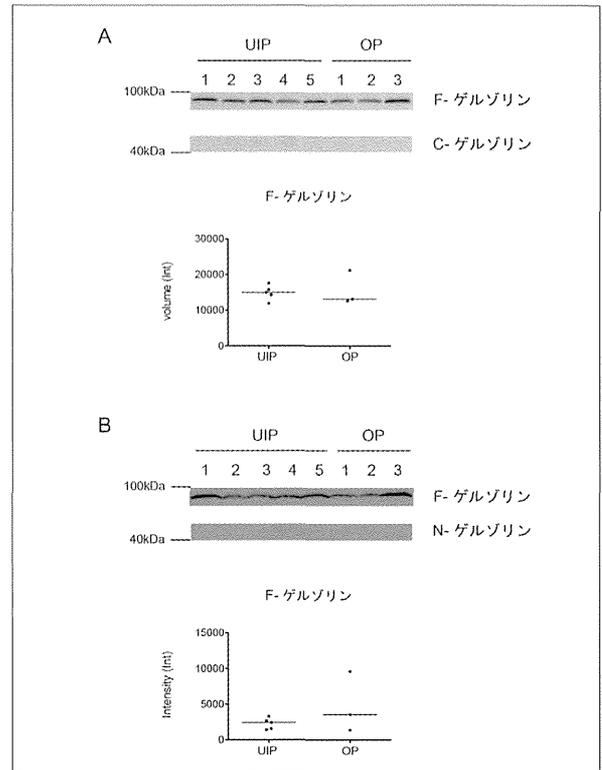


図 4 血清のウェスタンブロッティング
 (A) C-ゲルゾリンは血清中に認められなかった。F-ゲルゾリンは両群間で差がなかった。(B) N-ゲルゾリンは血清中に認められなかった。F-ゲルゾリンは両群間で差がなかった。

を施行した。BALF において C-ゲルゾリンと N-ゲルゾリンは UIP 群が OP 群より増加していた。切断されていない完全長のゲルゾリン (full-length gelsolin : F-ゲルゾリン) は両群で差は認めなかった (図 3A, B)。血清中には C-ゲルゾリンと N-ゲルゾリンは認められなかった。F-ゲルゾリンは両群で差は認めなかった (図 4A, B)。

ELISA では BALF、血清ともに両群間で差は認めなかった (図 5A, B)。BALF 中ゲルゾリンと血清中ゲルゾリンの間に相関関係は認めなかった (図 5C)。

5. 肺組織でのゲルゾリンの発現

C-ゲルゾリンは肺胞上皮と間質の fibroblast に染まった。一方 N-ゲルゾリンは線毛上皮化生に染まった (図 6)。

D. 考察

今回の研究で、プロテオミクス解析によって RA-ILD 患者の BALF における発現の異なるタンパク質が明らかになった。UIP 群と OP 群で 6 つのタンパク質の発現に有意差を認めた。切断されたゲルゾリンが UIP 群で増加しており、RA-ILD の線維化の発症に関与している可能性がある。

本研究では BALF 中の C-ゲルゾリンと N-ゲルゾリンは、UIP 群が OP 群より増加していた。Oikonomou らは、プレオマイシン肺線維症モデルの肺抽出液において caspase-3 によって切断された C-ゲルゾリンと N-ゲルゾリンが増加することを示している。ゲルゾリンノックアウトマウスではプレオマイシンによる炎症や線維化が抑制されることから、N-ゲルゾリンが存在しないことで N-ゲルゾリンのアポトーシス作用が抑えられた結果であると考えられている。しかしこのモデルにおける C-ゲルゾリンの役割については示

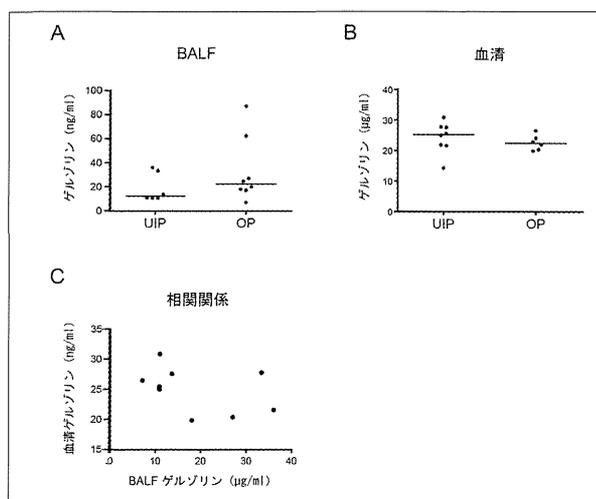


図5 ELISA (A) BALF中のゲルゾリンの濃度。(B) 血清中のゲルゾリンの濃度。(C) BALFと血清中のゲルゾリンの相関関係。

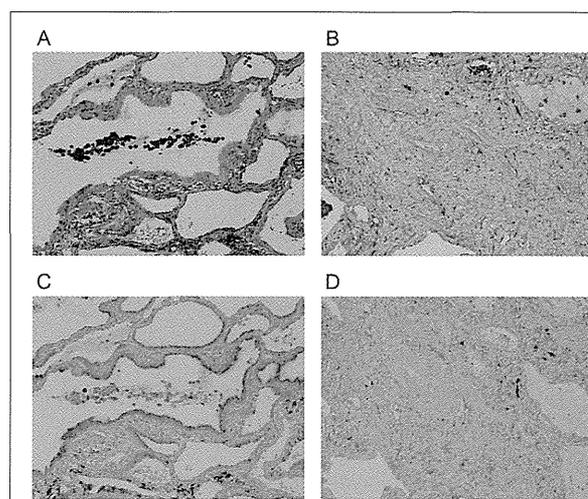


図6 ゲルゾリンの免疫組織学的染色 (A, B) C-ゲルゾリンは間質のfibroblastと肺胞上皮に染まっていた。(C, D) 線毛上皮化生に染まった。N-ゲルゾリンはfibroblastには染まらなかった。

されておらず明らかになっていない。⁸ Caspase-3の前駆体は細胞質に局在していることから、¹² BALF中に認められたC-ゲルゾリンとN-ゲルゾリンは肺内の細胞から分泌されたことになる。C-ゲルゾリンとF-ゲルゾリンはヒトの気管支上皮細胞から気道表面液中に分泌されることが示されている。¹³ C-ゲルゾリンとN-ゲルゾリンは相反する作用(抗アポトーシス作用とアポトーシス作用)を有しているが、それぞれが異なる細胞に発現するとしたら、いずれもRA-ILDの線維化に寄与する。本研究でUIP群の外科的肺生検検体の免疫組織学的染色を施行したところ、C-ゲルゾリンは間質のfibroblastに染まったが、N-ゲルゾリンは染まらなかった。C-ゲルゾリンのfibroblastへの抗アポトーシス作用が、RA-ILDの線維化の発症に関与している可能性がある。

本研究では、UIP群、OP群ともに血清中にC-ゲルゾリンとN-ゲルゾリンは認めなかった。これは、C-ゲルゾリンとN-ゲルゾリンが肺局所に発現しており血液中から循環してきたものではないことを示している。F-ゲルゾリンについては、BALF、血清いずれにおいても両群間で差は認めなかった。BALF中のタンパク質の多くは血液由来

であり、¹⁴ F-ゲルゾリンは主要な血中タンパク質であることから、⁶ BALF中のF-ゲルゾリンは血液由来である可能性がある。

我々は以前にも、BALFのプロテオミクス解析によって強皮症に合併した間質性肺炎や慢性過敏性肺炎の肺線維化にかかわるタンパク質について検討してきた。これらの研究においては肺線維化にかかわるタンパク質としてゲルゾリンは検出されなかった。^{11,15} 切断されたゲルゾリンはRA-ILDの肺線維化に特異的なタンパク質である可能性がある。仮説となるが、RA-ILDの線維化した肺内でcaspase-3がゲルゾリンをC-ゲルゾリンとN-ゲルゾリンに切断し、気道表面液中に分泌され、抗アポトーシス作用をもつC-ゲルゾリンがfibroblastに発現し、抗アポトーシス作用をもったfibroblastがRA-ILDの肺線維化を誘導する、という可能性がある。

最近、IPFとfibrotic NSIPの患者においてゲルゾリンの発現が増加することが報告されているが、それがF-ゲルゾリンであるか切断されたゲルゾリンであるかは言及されておらず不明である。今後RA-ILDとIPFでどのようなゲルゾリンの発現の違いがあるか検討していく必要がある。

E. 結論

本研究で RA-ILD の UIP 群と OP 群で発現の異なるタンパク質が明らかになった。C-ゲルゾリンと N-ゲルゾリンは RA-ILD の肺線維化の発症に関与している可能性がある。

参考文献

- 1 Ascherman DP. Interstitial lung disease in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2010;12:363-9.
- 2 Tsuchiya Y, Takayanagi N, Sugiura H, *et al.* Lung diseases directly associated with rheumatoid arthritis and their relationship to outcome. *The European respiratory journal* 2011;37:1411-7.
- 3 Nakamura Y, Suda T, Kaida Y, *et al.* Rheumatoid lung disease: Prognostic analysis of 54 biopsy-proven cases. *Respiratory medicine* 2012;106:1164-9.
- 4 Li GH, Arora PD, Chen Y, *et al.* Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases. *Med Res Rev* 2012;32:999-1025.
- 5 Kwiatkowski DJ. Functions of gelsolin: Motility, signaling, apoptosis, cancer. *Current opinion in cell biology* 1999;11:103-8.
- 6 Bucki R, Levental I, Kulakowska A, *et al.* Plasma gelsolin: Function, prognostic value, and potential therapeutic use. *Curr Protein Pept Sci* 2008;9:541-51.
- 7 Datta R, Kojima H, Yoshida K, *et al.* Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase c theta in induction of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:20317-20.
- 8 Oikonomou N, Thanasopoulou A, Tzouveleki A, *et al.* Gelsolin expression is necessary for the development of modelled pulmonary inflammation and fibrosis. *Thorax* 2009;64:467-75.
- 9 Aidinis V, Carninci P, Armaka M, *et al.* Cytoskeletal rearrangements in synovial fibroblasts as a novel pathophysiological determinant of modeled rheumatoid arthritis. *PLoS Genet* 2005;1:e48.
- 10 Osborn TM, Verdrengh M, Stossel TP, *et al.* Decreased levels of the gelsolin plasma isoform in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2008;10:R117.
- 11 Shirahama R, Miyazaki Y, Okamoto T, *et al.* Proteome analysis of bronchoalveolar lavage fluid in lung fibrosis associated with systemic sclerosis. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 2010;59:409-15.
- 12 Kamada S, Kikkawa U, Tsujimoto Y, *et al.* Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein (s) . *The Journal of biological chemistry* 2005;280:857-60.
- 13 Candiano G, Bruschi M, Pedemonte N, *et al.* Gelsolin secretion in interleukin-4-treated bronchial epithelia and in asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1090-6.
- 14 Wattiez R, Falmagne P. Proteomics of bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2005;815:169-78.
- 15 Okamoto T, Miyazaki Y, Shirahama R, *et al.* Proteome analysis of bronchoalveolar lavage fluid in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 2012;61:83-92.

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

a. 「Suhara K, et al. Proteomics analysis of BALF in rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease with usual interstitial pneumonia pattern」として2013年米国胸部学会総会で発表

b. 「須原ら, リウマチ肺の気管支肺胞洗浄液におけるプロテオミクス解析」として2013年第53回日本呼吸器学会学術講演会で発表

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

D1CC マウスリウマチモデルの肺病変の病理形態学的に解析と高濃度水素分子 (H₂) 水飲水の病変に対する効果

寺崎 泰弘¹⁾、國保 成暁¹⁾、漆山 博和¹⁾、寺崎 美佳¹⁾、
功刀 しのぶ¹⁾、丸山 基世²⁾、秋元 敏雄²⁾、金澤 智³⁾

1 日本医科大学大学院解析人体病理学

2 日本医科大学実験動物管理室

3 名古屋市立大学大学院細胞分子生物学

背景、目的：D1CC マウスリウマチ Rheumatoid arthritis (RA) モデルは関節にヒトの RA 病変と類似した病変を発症した上で、骨密度減少、関節 RA マーカーの抗 CCP 抗体の産生上昇を伴う。後に肺線維化病変を生じ、ヒトの RA 病態と全体像も含めて類似性高い新規の関節 RA マウスモデルである。関節リウマチの誘因、病態に過剰な酸化ストレスの関与が指摘されている。今回新規 D1CC マウス RA 肺モデルを用い、病変形成過程を病理形態学的に解析する。また抗酸化、抗炎症作用のある高濃度水素分子 (H₂) 治療による病変形成への効果を検討した。

方法、結果：10 ヶ月の早期病変では気管支や血管、胸膜の周囲の広義間質にリンパ球、形質細胞、好酸球、組織球の浸潤がみられた。肺胞領域にも散在性、小血管中心性にリンパ球浸潤や周囲気腔内の組織球集簇と Sp-C 陽性の 2 型肺胞上皮の過形成を伴う早期の線維化病変が見られた。18 ヶ月の後期進行病変では広義間質から肺全体に細胞浸潤と線維化病変がみられた。線維化病変はより末梢の肺胞領域中心に形成され、肺胞腔に泡沫状組織球集簇と壁在型、ポリープ状の腔内線維化を伴い線維化が進展していた。肺線維症動物モデルとして使用されているブレオマイシン肺線維症マウスモデルは急性一亜急性の病態で進行が一過性であり、D1CC マウス RA 肺モデルは病変の質、病変のできてくる期間、病変分布も大きく異なっていた。

D1CC マウス RA 肺モデルでは、血中の SP-D 上昇や胸部 CT 画像の肺野濃度上昇が 10 ヶ月でみられたが、高濃度 H₂ 水投与で有意に抑制された。組織学的にも広義間質の炎症細胞浸潤や肺胞領域の組織球集簇と線維化所見は H₂ 水治療で抑制された。

結論：D1CC マウス RA 肺病変モデルはその全体像を含めてヒトの RA 肺病変に類似しており、広くヒトの進行性慢性間質性肺炎の病態解明の手段としても多大な貢献が期待できると思われた。血清 Sp-D 値、胸部 CT 画像は組織の肺胞上皮障害所見を反映しており、マウスモデルの肺障害の良いマーカーになると思われた。高濃度 H₂ 水治療により RA 肺病変形成が抑制され、副作用のない治療薬としての臨床応用の可能性が示された。

【背景】

リンパ球浸潤性の肺病変は、IgG4 関連病変の概念など一部病態解明の進展があるが、まだ不明な部分も多く、特にリウマチ (Rheumatoid arthritis:RA) 肺などは高齢者での RA の 1% 以上

の高発症率に伴って増加がみられる。また抗 RA 薬 (DMARDs) や生物学的製剤が開発されているが、治療薬に伴う肺病変の増加もあり RA 肺は今後ますます問題なる。D1CC (DBA/1, Collagen type II promoter/enhancer-driven CIITA) マウスは、

MHC クラス II のマスタースイッチ、CIITA (Class II Transactivator) 遺伝子を II 型コラーゲン Col II プロモーター、エンハンサー下に導入し関節軟骨特異的 MHC クラス II 発現誘導したトランスジェニックマウスである。従来のマウス Col II 誘導性関節炎モデル (collagen-induced arthritis, CIA) と比較し、低濃度の Col II 接種で緩徐に高い発症率で関節炎を形成し、病理学的にヒト関節 RA と酷似し、滑膜細胞の異常増殖、炎症細胞の浸潤、パンス形成、骨密度減少、関節破壊強直状態となる。また新規関節 RA 初期マーカーの抗 CCP 抗体の産生も高値となり、特に間質性肺炎が併発するなどヒトの RA 病態と全体像も含めて類似性高い新規の関節 RA マウスモデルであり、特に肺病変は進行性の慢性肺線維症のモデルとしても重要なモデルである (1)。

RA は攻撃対象となる抗原自身は不明の自己免疫疾患であり自分免疫が関節などを攻撃するが、感染症、喫煙など過剰な酸化ストレスが原因、引き金といわれ、また RA 関節炎が慢性化し活性化された免疫細胞が酸化ストレスを助長しているといわれている (2)。一方、水素分子 (H_2) は抗酸化作用、抗炎症作用があり、我々の報告も含め様々な酸化障害動物モデルで抗酸化による障害抑制効果を示し、副作用の少ない独創的な抗酸化剤として臨床応用が期待されるが (3)、水素分子を高濃度に含む『水素水』の飲水だけでも抗酸化、抗炎症作用がみられる報告がある (4)。

今回、D1CC マウスを用い、新規 RA 肺モデルの進行性の慢性肺病変の形成過程を病理形態学的に解析した。また高濃度水素分子 (H_2) 治療による病変への効果を検討した。

【方法】

1) H_2 水の作製

H_2 水 (水素分子の飽和水) は通常動物用水に 100% H_2 ガスをガスボンベで半日以上加圧し飽和させて作製し (およそ 640 μ M)、コントロールとして水素分子の飽和する前の通常動物用水を通常水 (W 水) とした。

2) D1CC マウス RA 肺モデル作製

生後 8 週齢の雄 D1CC マウスを用い、Day0 に牛 II 型コラーゲン (bCII:10 μ g) 溶解 0.01M 酢酸を complete Freund's adjuvant で乳状にし、しっぽ中枢側と左右の鼠径部と腋窩部のリンパ節近傍の計 5 か所に分けて皮下注射した。更に 3 週ごと 4 回 bCII を incomplete Freund's adjuvant で乳状にして同様に boost 注射し RA 肺モデル作製した (1)。この間、 H_2 -treatment (+) 群 (記号:H 群) として H_2 水を、 H_2 -treatment (-) の Water 群 (記号:W 群) として W 水を Day0 から密閉球状栓つきの特殊給水瓶で毎日交換して自由摂取させた (3)。また、0.01M 酢酸と adjuvant のみの乳状液を同様に皮下注射して W 水を自由摂取させた群をコントロール群 (記号:C 群) とし 3 群に分けて検証を行った。

3) マウス RA 肺モデルの評価

- Acute phase (10 ヶ月) では血清 Sp-D の測定、病理学的検索として HE、EMG、AL-PAS 染色の他、T cell、B cell、好中球、組織球、MCP1、IL-6、MnSOD、4HNE、8-OHdG の免疫染色を行った。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- β 1 の発現量を Western blot 法にて解析した。
- Late phase (18 ヶ月) 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、EMG 染色で Ashcroft score を測定し、T cell、B cell、好中球、組織球、MCP1、IL-6、MnSOD、4HNE、8-OHdG の免疫染色を行った。

【結果】

1) 新規 RA 肺モデル D1CC マウス (W 群) の肺病変形成過程

D1CC マウス RA 肺モデルでは 10 ヶ月になってから血清 Sp-D の Cut-off: 53.9 ng/ml を超える上昇がみられ始めた。肺の病変の病理所見も、この時期には比較的中枢側部位も含め気管支、血管と胸膜の周囲の、いわゆるリンパ路に沿った広義

間質領域に好酸球、好中球、組織球を伴ってリンパ球、形質細胞などの lymphoid cell が主体の炎症細胞浸潤がみられた (図 1)。リンパ球浸潤は全体に B 細胞と T 細胞とともに優位な差はなく見られた (図 2)。肺胞領域にも小血管や終末細気管支中心性に散在性にリンパ球浸潤や組織球集族を伴って Sp-C 陽性の肺胞上皮の過形成を伴う肺胞上皮障害と早期の線維化病変が見られた (図 3)。

18 ヶ月になると血清 Sp-D は 200 ng/ml を超える更なる上昇がみられた。この後期進行病変では広義間質から肺全体に細胞浸潤と Sp-C 陽性の肺胞上皮の過形成を伴う肺胞上皮障害所見と線維化

病変がみられた (図 4)。強い線維化病変自体はより末梢の小葉中心性の肺胞領域中心に形成されていた。その周囲の肺胞腔には泡沫状組織球の集族と壁在型、ポリープ状の腔内線維化を伴って線維化を進展させていた。リンパ濾胞も散在していた (図 5)。

Adjuvant のみを同様に皮下注射して W 水を自由摂取させたコントロール群のマウスには優位な変化や病変はいずれの時期にもみられなかった。

2) 高濃度水素分子 (H₂) 治療による効果。

D1CC RA 肺モデルマウス (W 群) では、コントロール群 (C 群) に比べ血中の Sp-D 上昇 (図 6)

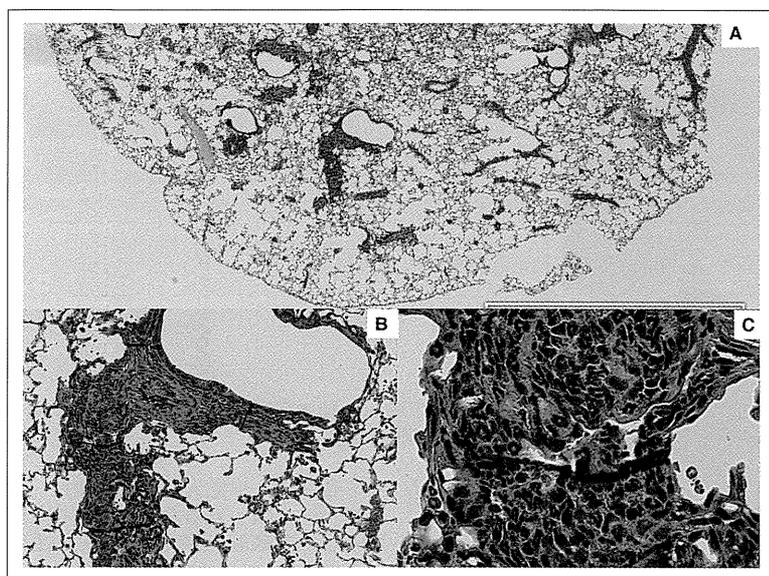


図 1
10 ヶ月での RA 肺モデル D1CC マウス (W 群) の肺病変 (HE 像)。

A) 弱拡大、B) 中拡大: 気管支、血管周囲の広義間質領域に炎症細胞浸潤がみられる。
C) 強拡大: 好酸球、好中球、組織球を伴ってリンパ球、形質細胞などの lymphoid cell が主体の炎症細胞浸潤がみられる。

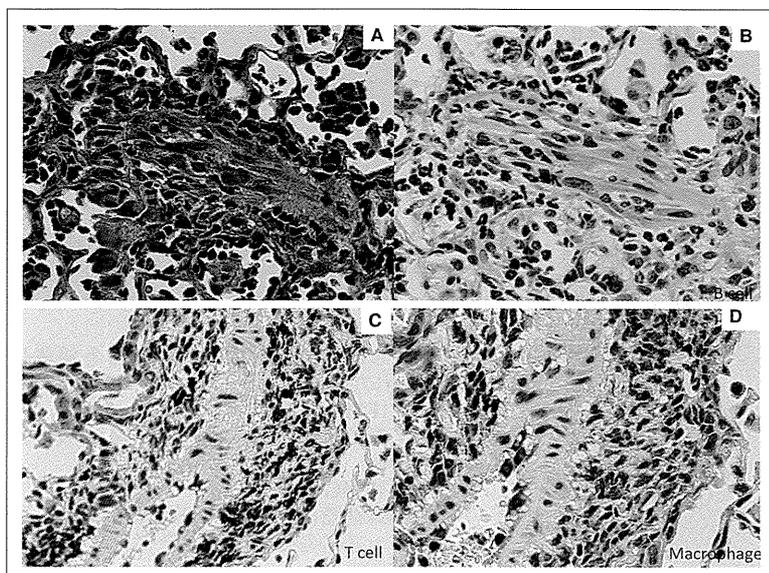


図 2
10 ヶ月での RA 肺モデル D1CC マウス (W 群) の肺病変の炎症細胞。

A) HE 像、B) B 細胞、C) T 細胞、D) 組織球: リンパ球浸潤は全体に B 細胞と T 細胞とともに優位な差はなくみられる。

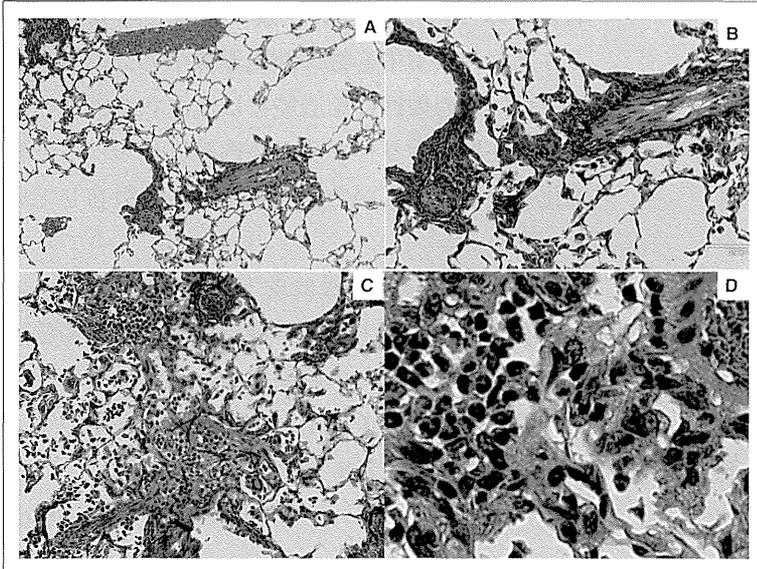


図 3
10 ヶ月での RA 肺モデル D1CC マウス (W 群)
の肺胞領域の肺病変。

- A) 弱拡大 (HE 像)、B) 中拡大 (EMG 像) :
肺胞領域にも小血管や終末細気管支中心性に
散在性にリンパ球浸潤を伴う。
C) 中拡大 (EMG 像)、D) 強拡大 (HE 像)。
リンパ球浸潤や組織球集簇を伴って肺胞上皮
障害と早期の線維化病変が見られる。

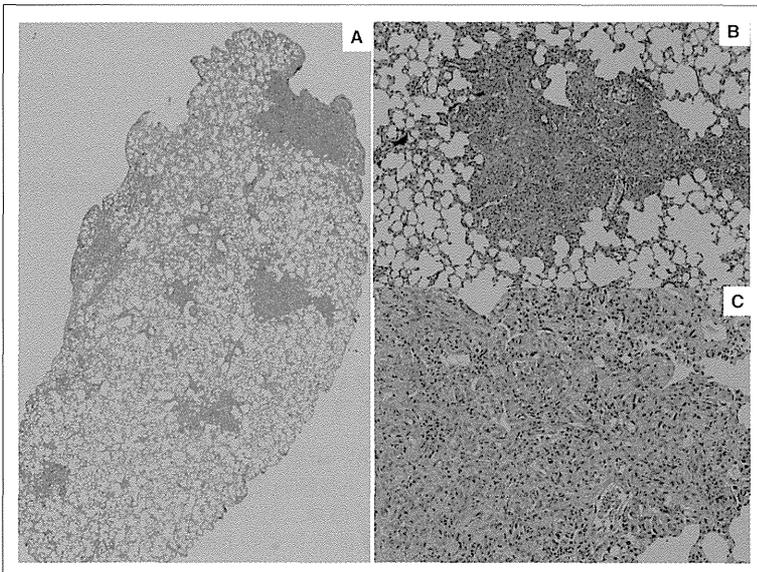


図 4
18 ヶ月での RA 肺モデル D1CC マウス (W 群)
の散在性肺病変。

- A) 弱拡大 (HE 像)、B) 中拡大 (EMG 像)、
C) 強拡大 (HE 像) : 強い線維化病変自体はよ
り末梢の小葉中心性の肺胞領域中心に散在性
に形成されている。

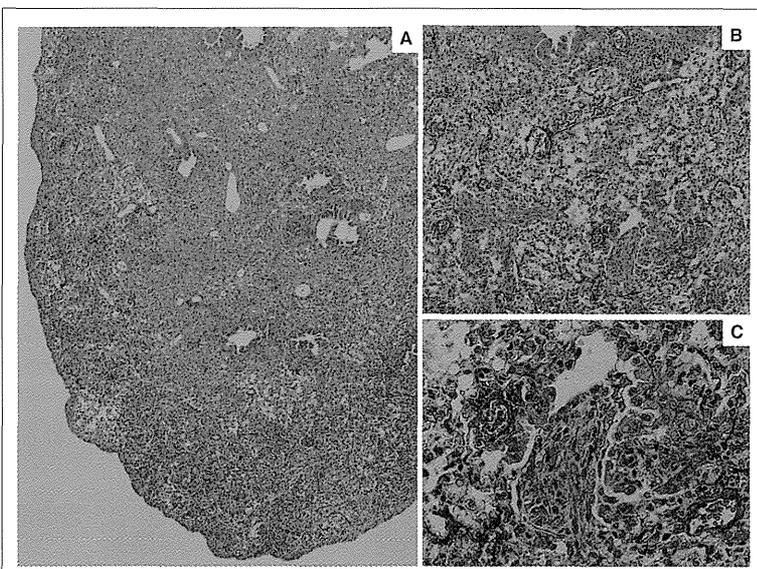


図 5
18 ヶ月での RA 肺モデル D1CC マウス (W 群)
の広範進行性肺病変。

- A) 弱拡大 (HE 像) :
広義間質から広範に肺全体に細胞浸潤と線維化
病変がみられた。
B) 中拡大 (EMG 像) :
強い線維化病変自体はより末梢の肺胞領域中心
に形成される。
C) 強拡大 (EMG 像) :
その周囲の肺胞腔には泡沫状組織球の集簇と壁
在型、ポリープ状の腔内線維化を伴って線維化
を進展させている。

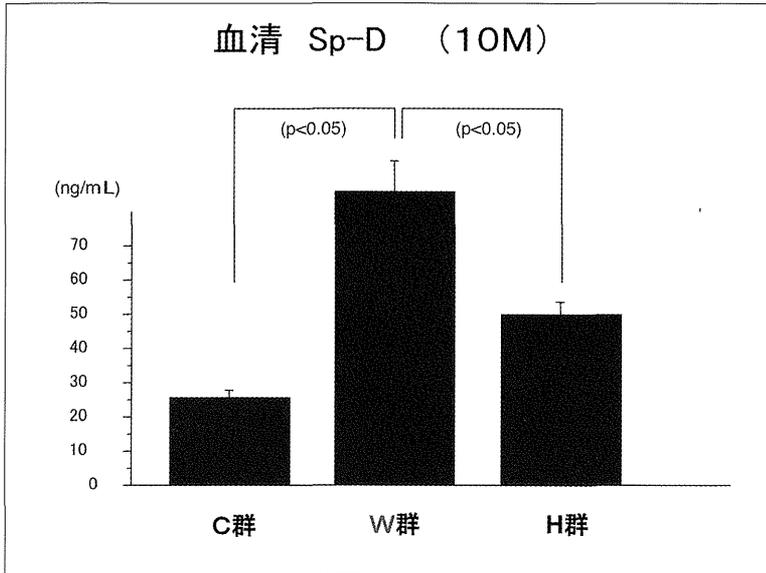


図6
10 ヶ月での血中の Sp-D

D1CC RA 肺モデルマウス群 (W 群) では、コントロール群 (C 群) に比べ血中の Sp-D 上昇が優位にみられたが、高濃度 H₂ 水投与した群 (H 群) では有意に抑制された。

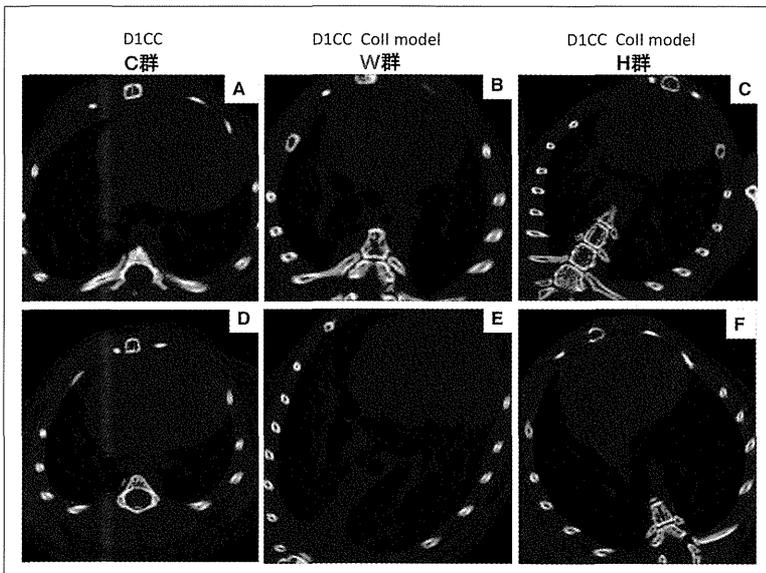


図7
18 ヶ月での RA 肺モデル D1CC マウス群 (W 群) の胸部 CT 画像。

B) 中肺野、E) 下肺野の D1CC RA 肺モデルマウス群 (W 群) では、A) 中肺野、D) 下肺野のコントロール群 (C 群) に比べ胸部 CT 画像の肺や濃度上昇が優位にみられたが、C) 中肺野、F) 下肺野の高濃度 H₂ 水投与した群 (H 群) では有意に抑制されていた。

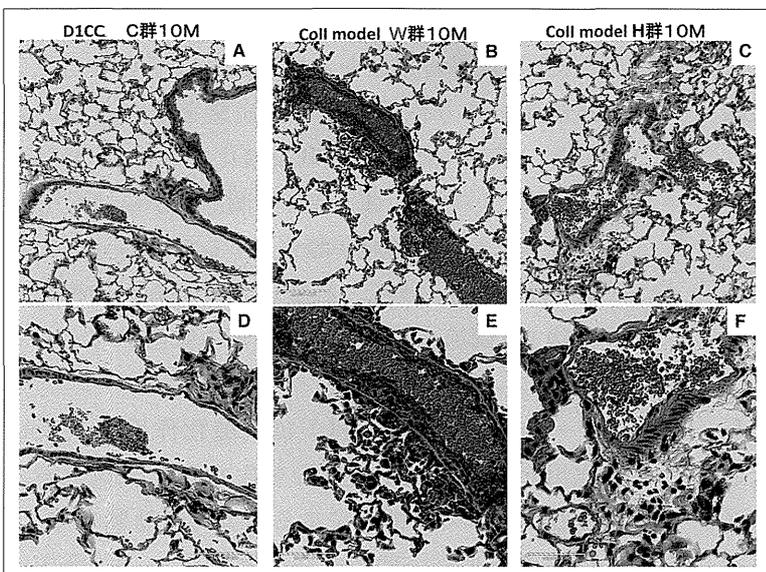


図8
10 ヶ月での RA 肺モデル D1CC マウス (W 群) の肺病変 (HE 像)

B) 中拡大、E) 強拡大の D1CC RA 肺モデルマウス群 (W 群) では、A) 中拡大、D) 強拡大のコントロール群 (C 群) に比べ血管周囲の炎症細胞浸潤や肺泡領域の組織球集簇と肺胞上皮障害や線維化所見がみられたが、C) 中拡大、F) 強拡大の高濃度 H₂ 水投与した群 (H 群) では有意に抑制されていた。