

や胸部 CT 画像の肺野濃度上昇 (図 7) が優位にみられたが、高濃度 H₂ 水投与した (H 群) ではいずれも有意に抑制された。組織学的にも 10 ヶ月、18 ヶ月いずれも広義間質の炎症細胞浸潤や肺胞領域の組織球集簇と肺胞上皮障害所見や線維化所見は H₂ 水治療で抑制されていた (図 8)。

【考察】

1) D1CC マウス RA 肺モデルについて

D1CC マウス RA 肺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 マウスモデルであり、肺病変は進行性の慢性肺線維症のモデルとして重要なモデルである (1)。

実際、我々が解析した D1CC マウス RA 肺モデルでは、作製開始して 10 ヶ月になってから血清 Sp-D の上昇がみられ始め、肺の病変の病理所見も、この時期になって、いわゆる広義間質にリンパ球、形質細胞などの lymphoid cell が主体の炎症細胞浸潤がみられ始めた (図 1)。線維化病変自体はより末梢の肺胞領域の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った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から始まり (図 3)、18 ヶ月の後期では周囲の肺胞腔に泡沫状組織球の集簇と壁在型、ポリープ状の腔内線維化病巣を伴って線維化が進展していた (図 4, 5)。

一般に RA に限らずヒト膠原病肺病変には、広義間質にリンパ球、形質細胞などの lymphoid cell が主体の慢性炎症細胞浸潤がみられる。またマッソン体と呼ばれる病巣は、元来ヒトの RA 肺病変でみられる、このポリープ状の腔内線維化病変で呼ばれた言葉であり (5)、D1CC マウス RA 肺モデルはヒトの RA 肺と類似性が高い病変と思われた。

一方、従来の肺線維症動物モデルとしてのブレオマイシン誘発肺線維症マウスモデルは、経気道的なブレオマイシン投与だと 1 週間程度で末梢気道分布に沿って肺胞領域まで上皮障害と多彩な炎

症細胞浸潤がみられ、2 週から活動性線維化も明らかになり、4 週程度で炎症細胞浸潤や線維化の進行は収まっていく、およそ 1 カ月間の一過性の薬剤障害性に伴う線維化モデルである (6, 7)。

従って、ブレオマイシンマウスモデルは、この RA 肺モデルと比較して、より急性で上皮障害が強く、浸潤炎症細胞も急性の炎症細胞を含めて多彩であり、リンパ濾胞なども乏しく、病態の進行が一過性であり、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。肺線維症動物モデルとしては、ブレオマイシン誘発肺線維症マウスモデルがよく使用されてはいるが、このような急性一重急性の病態で、進行が一過性である薬剤性肺障害モデルである為、慢性進行性の肺線維症病態の解析には限界があると思われる。一方、D1CC マウス RA 肺モデルは広義間質に慢性炎症細胞浸潤を伴い、末梢の肺胞領域にリンパ球浸潤を伴った早期の線維化病変伴って線維化を進展させており、よりヒトの RA 肺に類似していた。また広くヒトの進行性の慢性間質性肺炎の病態としても類似性が高く、新規の慢性間質性肺炎のマーカーや治療薬の探索など病態の解明などにおいて多大な貢献が期待できるマウスと思われた。また血清 Sp-D の測定値は組織の肺胞上皮障害所見を反映しており、肺障害の良いマーカーになると思われた。

2) 高濃度水素分子 (H₂) 治療による効果について

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関節炎などの病態を呈するが、感染症、喫煙 (8) など過剰な酸化ストレスが原因、引き金といわれ、また RA の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 (2, 9, 10)。実際、抗酸化効果がある治療薬で動物 RA 関節炎モデルでの改善の報告がみられる (11, 12)。

一方、水素分子 (H₂) 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 (3)。H₂ の抗酸化作用は・OH、ONOO⁻などの酸化力が強い活性酸素種 (ROS) を選択的に還元し、高い生体膜通過性によるものと考えられるが、一方で、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)。

今回は慢性の酸化ストレスが病態に関連すると思われる RA 肺モデルについて H₂ 水飲水治療の効果を検討したが、組織学的に治療のない D1CC モデルマウス (W 群) でみられた広義間質の炎症細胞浸潤や肺胞領域の組織球集積と線維化所見は H₂ 水治療で抑制されていた (図 8)。これには RA において、組織球、好中球、リンパ球などを中心とした持続して徐々に生じる局所での NADPH oxidase、xanthine oxidase、nitric oxide synthase (NOS) や mitochondrial respiratory chain の機能障害などから生じる ROS (H₂O₂、O₂・⁻、ONOO⁻など) が持続的に発生する報告がある (13, 14)。肺は呼吸代謝臓器であり、血管豊富でルーズな組織臓器的な構造である為 H₂ が拡散するには有利であり、マウスの H₂ 水飲水実験では飲水 3 分後には ROS を直接消去軽減できるという報告があるので、RA 病態の局所の ROS 対して H₂ 水飲水による抗酸化効果が効果した可能性があげられた。実際、持続的酸化ストレスが病因としてあげられる apolipoprotein E の KO マウス動脈硬化病変 (16)、マウスでのシスプラチン腎障害病変 (15)、移植ラット腎症病変 (17) や Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) モデル病変 (18) なども H₂ 水飲水で病変形成が抑制されている。

しかし H₂ 水飲水では H₂ は短時間で低濃度になる為 (15)、H₂ 水飲水の効果は直接の ROS の消去以外の機序も考えられる。例えば、H₂ 水飲水で SOD 活性が増加する報告があるので (19)、今回、局所の H₂O₂ や O₂・⁻ の抑制には増加した SOD 活性が影響した可能性がある。更に近年では H₂ 分子がマクロファージにおいてシグナル伝達の調節を介してリポ多糖 / インターフェロン γ 誘導性の一酸化窒素 nitric oxide (NO) 産生を阻害する報告があり (20)、同様にシグナル伝達の調節などから、なんらかの抗炎症の効果をきた

している可能性もあげられた。

また、D1CC 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 上昇や胸部 CT 画像の肺野濃度上昇が優位にみられたが、高濃度 H₂ 水投与により (H 群) いずれも有意に抑制され、組織所見と一致していた (図 6, 7)。血清 Sp-D の測定は肺胞上皮障害所見を反映しており、胸部 CT 画像所見ともに、治療においても効果を推測するマーカーになると思われた。

今後、抗炎症効果につながる H₂ 水飲水に関するより詳細な作用機序を解析し、臨床応用への可能性も更に検討する。

【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モデル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。

参考文献

- 1 Kanazawa S, Ota S, Sekine C, *et al.* Aberrant MHC class II expression in mouse joints leads to arthritis with extraarticular manifestations similar to rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(39):14465-14470.
- 2 Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2008;152(3):415-422.
- 3 Terasaki Y, Ohsawa I, Terasaki M, *et al.* Hydrogen therapy attenuates irradiation-induced lung damage by reducing oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;301(4):L415-426.

- 4 Nakai Y, Sato B, Ushiyama S, Okada S, Abe K, Arai S. Hepatic oxidoreduction-related genes are upregulated by administration of hydrogen-saturated drinking water. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011;75(4):774-776.
- 5 Herbut PA, Manges WE. The "Masson Body" in Rheumatic Pneumonia. *Am J Pathol* 1945;21(4):741-751.
- 6 Terasaki Y, Fukuda Y, Ishizaki M, Yamanaka N. Increased expression of epimorphin in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(2):168-174.
- 7 Terasaki Y, Terasaki M, Urushiyama H, *et al.* Role of survivin in acute lung injury: epithelial cells of mice and humans. *Lab Invest* 2013;93(10):1147-1163.
- 8 Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ, Shin JI. Smoking and Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci* 2014;15(12):22279-22295.
- 9 Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6(6):265-278.
- 10 Winyard PG, Ryan B, Eggleton P, *et al.* Measurement and meaning of markers of reactive species of oxygen, nitrogen and sulfur in healthy human subjects and patients with inflammatory joint disease. *Biochem Soc Trans* 2011;39(5):1226-1232.
- 11 Radhakrishnan A, Tudawe D, Chakravarthi S, Chiew GS, Haleagrahara N. Effect of gamma-tocotrienol in counteracting oxidative stress and joint damage in collagen-induced arthritis in rats. *Exp Ther Med* 2014;7(5):1408-1414.
- 12 Sharma S, Gupta R, Thakur SC. Attenuation of Collagen Induced Arthritis by Centella asiatica Methanol Fraction via Modulation of Cytokines and Oxidative Stress. *Biomed Environ Sci* 2014;27(12):926-938.
- 13 Mapp PI, Grootveld MC, Blake DR. Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br Med Bull* 1995;51(2):419-436.
- 14 Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep* 2005;57 Suppl:108-119.
- 15 Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, Ohta S. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64(4):753-761.
- 16 Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377(4):1195-1198.
- 17 Cardinal JS, Zhan J, Wang Y, *et al.* Oral hydrogen water prevents chronic allograft nephropathy in rats. *Kidney Int* 2010;77(2):101-109.
- 18 Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci* 2013;14(10):20704-20728.
- 19 Gu Y, Huang CS, Inoue T, *et al.* Drinking hydrogen water ameliorated cognitive impairment in senescence-accelerated mice. *J Clin Biochem Nutr* 2010;46(3):269-276.
- 20 Itoh T, Hamada N, Terazawa R, *et al.* Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon gamma-induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;411(1):143-149.

Syndecan-4 は肺の線維化を抑制する

谷野 功典¹、王 新涛¹、福原 奈緒子¹、二階堂 雄文¹、美佐 健一¹、佐藤 祐樹¹、
東川 隆一¹、鈴木 康仁¹、植松 学¹、福原 敦朗¹、佐藤 俊¹、斉藤 純平¹、
横内 浩¹、谷野 美智枝²、棟方 充¹

1 福島県立医科大学医学部 呼吸器内科学講座

2 北海道大学大学院医学研究科 病理学講座腫瘍病理学

Syndecan-4 (Sdc4) は細胞表面に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンで、そのグリコサミノグリカン側鎖は成長因子などと結合し、種々の生理学的作用を示す。これまで我々は、LPS 気管内投与モデルにおいて、*Sdc4* 欠損マウスでは、wild-type マウスより BAL 液中好中球が多く、KC、MIP-2 濃度が高いことを報告し、肺の急性炎症において Sdc4 が抑制作用をもつことを示した。しかし、肺の線維化における Sdc4 の役割は十分解明されていない。そこで、wild-type と *Sdc4* 欠損マウスに Bleomycin (BLM) を気管内投与し肺の線維化を比較検討したところ、BLM 投与 14 日後の肺組織の collagen と α -SMA mRNA の発現、21 日後の肺組織 collagen 量、病理学的肺線維化スコアは *Sdc4* 欠損マウスで wild-type マウスより高かった。しかし、BLM 投与 7、14 日後の BAL 液中総細胞数、細胞分画に大きな差はなく、肺組織中 TGF- β の発現にも差を認めなかった。これまでの我々のヒト肺線維芽細胞株 WI-38 を使用した *in vitro* の検討では、recombinant Sdc4 の co-incubation は TGF- β による COL1A1、 α -SMA mRNA の発現と Smad3 のリン酸化を抑制し、siRNA による Sdc4 knockdown は TGF- β による COL1A1、 α -SMA mRNA の発現を増強したことから、Sdc4 は肺の線維化抑制効果をもち、その作用の少なくとも一部は TGF- β の作用抑制を介していると考えられる。

はじめに

ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) である syndecan はヒトでは syndecan-1 から 4 までの 4 種類が存在する。syndecan-1 は主に上皮細胞と形質細胞、syndecan-2 は線維芽細胞と血管内皮細胞、syndecan-3 は神経細胞の細胞表面に比較的特異的に発現しているが、syndecan-4 は様々な種類の細胞に発現している¹⁾。Syndecan は matrix metalloproteinase (MMP) -7,9 や ADAM17 などにより細胞表面から切断され、細胞表面型のみではなく可溶性 (soluble form) としても存在し^{2,5)}、そのヘパラン硫酸側鎖は種々の cytokine, chemokine, growth factor と結合することによって、その生物学的な活性を調節していると考えられている⁶⁾。

我々はこれまでに LPS 気管内投与後のマウス肺組織における HSPG mRNA の発現を検討したところ、syndecan-4 (*sdc4*) のみの上昇が認められ、他の HSPG には変化がみられなかった。また、*sdc4* 欠損マウスに LPS を気管内投与し野生型 (WT) マウスと比較検討したところ、LPS 気管内投与 3, 6 時間後の BAL 液中好中球は *sdc4* 欠損マウスにおいて WT マウスと比較して多く、BAL 液中の CXC chemokine である KC, MIP-2 も *sdc4* 欠損マウスで WT マウスよりも高値であった⁷⁾。これらの結果は、syndecan-4 は LPS 肺障害において抗炎症作用をもつことを示唆している。我々はまた、ヘパラン硫酸などプロテオグリカン (PG) の側鎖であるグリコサミノグリカン (GAG) に対

して結合性の弱い mutant IL-8 をマウスに気管内投与すると、wild-type IL-8 より多くの好中球が肺へ遊走し、より早く mutant IL-8 が血中に出現することを示し、GAG と chemokine の結合が肺への好中球遊走に重要な役割を果たしていることも明らかにしている⁸⁾。以上の結果より、肺の炎症の病態に syndecan-4 などの PG、GAG が重要な役割を果たしていると考えられる。

特発性肺線維症 (IPF) は、5 年生存率約 50% の予後不良の難治性肺線維化疾患であり、肺胞上皮細胞の過剰な apoptosis に引き続く組織の異常修復とそれに引き続く線維芽細胞からのコラーゲンなど細胞外マトリックスの過剰産生が病態の本体である⁹⁾。我々は、これまでにヒト

肺線維芽細胞 WI-38 を使用した *in vitro* の検討で、recombinant syndecan-4 の co-incubation が TGF- β による collagen と α -SMA の発現増加と Smad3 の活性化を抑制すること、また、siRNA による syndecan-4 の knockdown が TGF- β による collagen と α -SMA の発現増加を更に増強することを報告している¹⁰⁾。

以上の結果から、syndecan-4 は肺の線維化抑制作用をもつことが示唆されるが、今回我々は *in vivo* における syndecan-4 の肺線維化における役割を検討するために、*sdc4* 欠損マウスにおける bleomycin (BLM) 気管内投与後の変化をし、WT マウスと比較検討した。

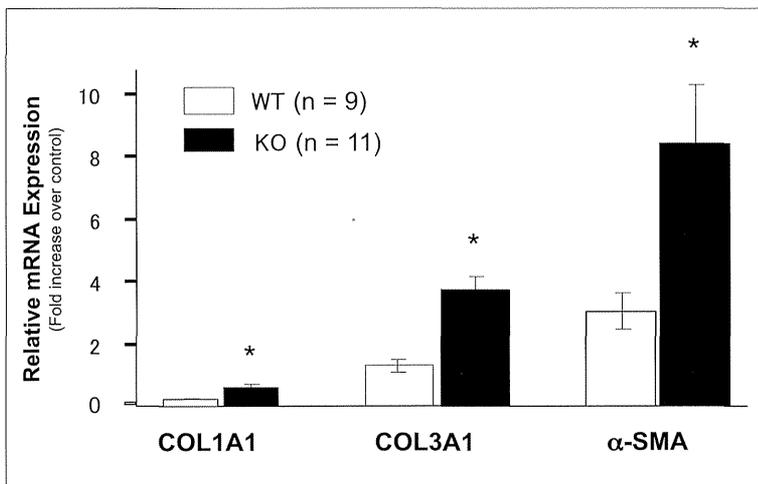


Figure 1. mRNA expression of type I (COL1A1) and III (COL3A1) collagen and α -SMA in lung tissues 14 days after intratracheal bleomycin instillation.

WT: wild type mice, KO: syndecan-4 deficient mice. * $p < 0.05$ vs WT; values are the mean \pm SEM

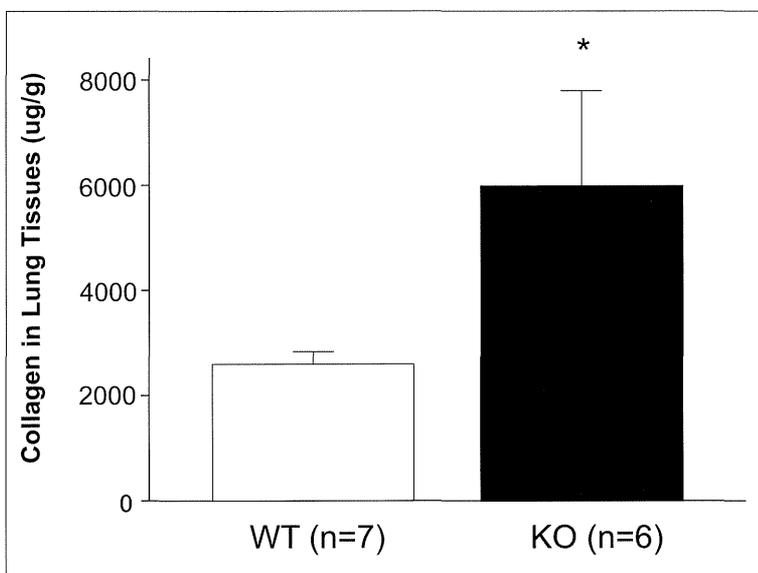


Figure 2. Collagen content in lung tissues 21 days after intratracheal bleomycin instillation.

WT: wild type mice, KO: syndecan-4 deficient mice. * $p < 0.05$ vs WT; values are the mean \pm SEM

方法と結果

1. BLM 投与後の肺線維化の検討

まずは初めに、*sdc4* 欠損マウスと WT マウスに BLM (2.5mg/kg) を気管内投与し、14 日後の肺組織における、type I collagen (COL1A1) と α -smooth muscle actin (α -SMA) mRNA の発現を定量的 real-time PCR (qPCR) にて比較検討した。*sdc4* 欠損マウスでは、WT マウスと比較して、COL1A1 と α -SMA mRNA 発現が明らかに高く (Figure 1)、さらに、BLM 投与 21 日後の sircol collagen assay による肺組織中 collagen 量は、*sdc4* 欠損マウスでは WT マウスより増加していた (Figure 2)。更に、病理学的肺線維化スコア (Ashcroft score) の検討でも *sdc4* 欠損マウスは WT

マウスより肺の線維化が強かった (Figure 3) (4.53 ± 0.22 vs 3.47 ± 0.16 , $p < 0.05$, $n = 4/\text{each group}$)。

2. BLM 投与後の BAL 液中細胞分画の検討

次に、*sdc4* 欠損マウスでの肺線維化増強の機序を明らかにするため、BAL 液の所見を検討した。BLM 気管内投与 7、14 日後の BAL 液の検討では、*sdc4* 欠損マウスにおいて WT マウスより 7 日後の好中球比率が低かったが、総細胞数やその他の所見には差がみられなかった (Figure 4a-c)。

3. BLM 投与後の肺組織中 TGF- β の検討

更に、*sdc4* 欠損マウスにおける肺線維化増強の機序を明らかにするため、TGF- β に着目して検

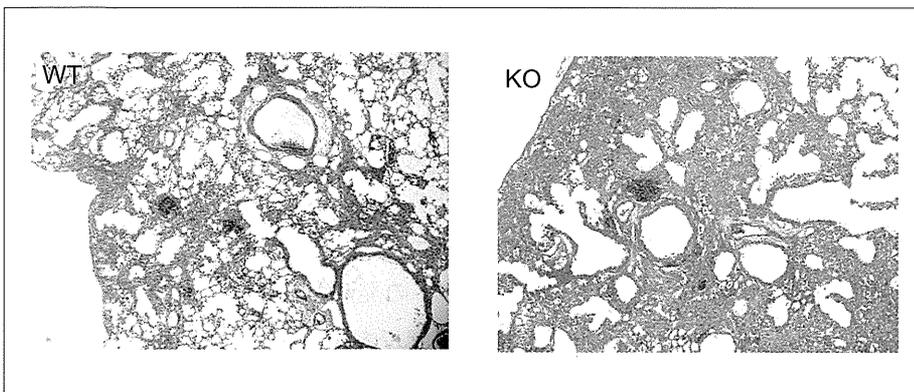


Figure 3. Histological findings 21 days after intratracheal bleomycin instillation.

WT:wild type mice, KO: syndecan-4 deficient mice. H&E staining. X40.

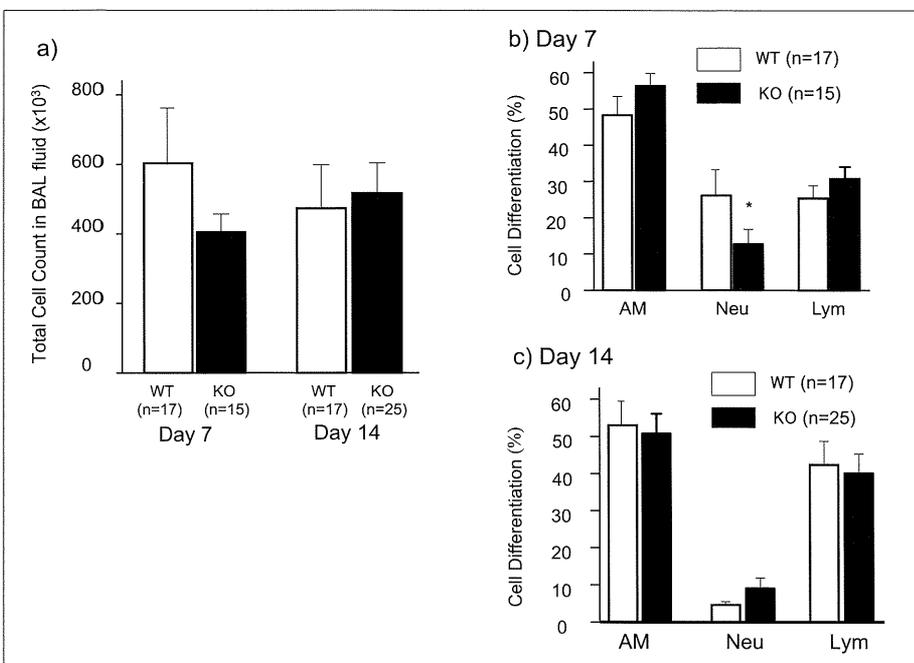


Figure 4: Total cell count and cell differentiation in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from wild-type (WT) and syndecan-4 knockout (KO) mice 7 and 14 after intratracheal bleomycin instillation.

* $p < 0.05$ vs. WT, mean \pm SEM.

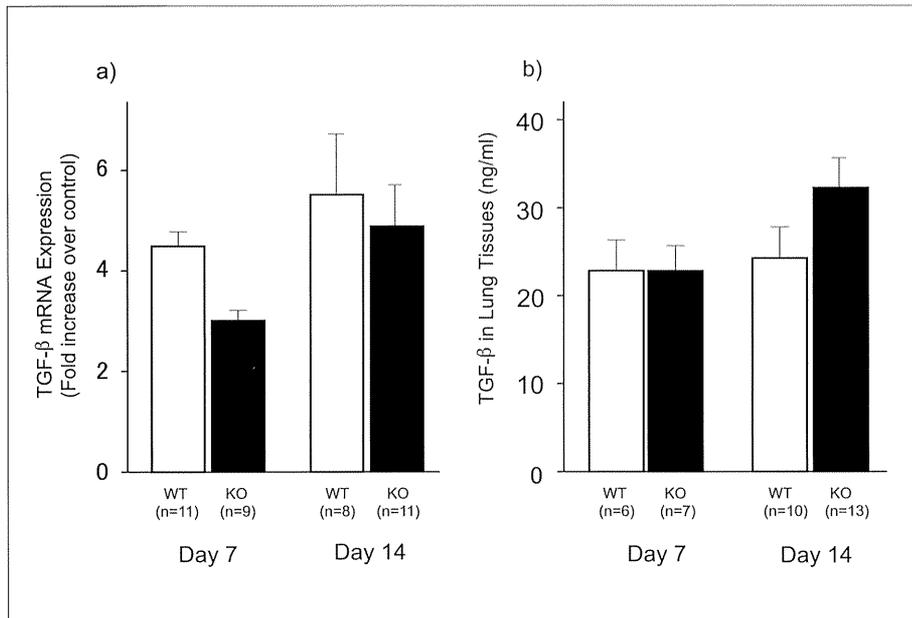


Figure 5. mRNA expression (a) and protein concentration (b) of TGF- β in lung tissues 7 and 14 days after intratracheal bleomycin instillation.

WT: wild type mice,
KO: syndecan-4 deficient mice.

討を行った。まず、BLM 気管内投与 7、14 日後の肺組織中 TGF- β mRNA 発現を比較したが、*sdc4* 欠損マウスと WT マウスでは差が認められなかった (Figure 5a)。更に、肺組織中の TGF- β 蛋白濃度も比較したが、mRNA 同様に *sdc4* 欠損マウスと WT マウスで差が認められなかった (Figure 5b)。

考察

今回、我々は肺線維化における syndecan-4 の *in vivo* における役割を明らかにするために、*sdc4* 欠損マウスを使用して BLM 気管内投与後の肺の線維化を検討した。*sdc4* 欠損マウスでは、WT マウスと比較して BLM 投与後の肺の線維化が増強していたが BAL 液の細胞分画には大きな差がなく、肺組織中の TGF- β の発現にも差がみられなかった。

これまで、我々の *in vitro* の検討では、肺線維芽細胞 WI-38 において recombinant syndecan-4 と TGF- β の co-incubation は TGF- β による collagen と α -SMA mRNA の発現増加と Smad3 の活性化を抑制し、siRNA による syndecan-4 の knockdown は TGF- β による collagen と α -SMA の発現増加を更に増強していた。Recombinant syndecan-4 は TGF- β と結合すること (data not

shown) から、これらの *in vitro* の結果は TGF- β が可溶性または細胞表面の syndecan-4 と結合することにより TGF- β 本来の receptor である TGF- β type II receptor との結合が阻害されていることによると考えられる。今回の *in vivo* の検討において *sdc4* 欠損マウスと WT マウスにおいて肺組織中の TGF- β の発現に差はみられなかったが、マウス肺組織内において syndecan-4 は *in vitro* の検討と同様に TGF- β と結合することによって TGF- β の作用を抑制していることが *sdc4* 欠損マウスにおいて WT マウスより肺の線維化が増強していた原因のひとつと考えられる。

Jiang らは、我々と同様に *sdc4* 欠損マウスにおける BLM 気管内投与後の肺の線維化を検討している。その検討でも我々と同様に *sdc4* 欠損マウスで肺の線維化が増強していたが、彼らは syndecan-4 と抗線維化作用を持つ chemokine である CXCL10 とのヘパラン硫酸側鎖を介した結合が CXCL10 の線維芽細胞の遊走抑制することが原因と報告している¹¹⁾。また、Echtermeyer らは *sdc4* 欠損マウスでは血管新生や皮膚の組織修復作用に異常があることも報告しており¹²⁾、syndecan-4 は組織の傷害・修復に重要な役割を果たしていると考えられる。我々の気道上皮細胞株 BEAS-2B を使用した *in vitro* で検討では、

recombinant syndecan-4 の前処置が LPS や TNF- α による IL-8 mRNA の増加を抑制しており、syndecan-4 のヘパラン硫酸側鎖を介した TNF- α と recombinant syndecan-4 の結合が TNF- α と BEAS-2B 上の TNF- α receptor との結合を抑制することにより IL-8 mRNA 増加を抑制したと推察される⁷⁾。このように syndecan-4 はヘパラン硫酸側鎖と種々のメディエーターとの結合を介して、抗炎症作用や抗線維化作用を持つと考えられるが、細胞表面の syndecan-4 はコア蛋白を介して PKC α の活性化等の細胞内のシグナル伝達に直接関与しているとも報告されており^{13, 14)}、今後更に検討が必要である。

今回の検討により、syndecan-4 が肺線維化抑制作用をもつことが示唆された。IPF など難治性肺線維化疾患に対する syndecan-4 等の PG・GAG を target とした新規治療法の開発に向けて、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

文献

1. Gotte M. Syndecans in inflammation. *FASEB J* 17:575-591, 2003.
2. Rapraeger AC. Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol* 149:995-998, 2000.
3. Fitzgerald ML et al: Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* 48:811-824, 2000.
4. Pruessmeyer J et al: A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells. *J Biol Chem* 285:555-564, 2010.
5. Ramnath R et al. Matrix metalloproteinase 9-mediated shedding of syndecan 4 in response to tumor necrosis factor α : a contributor to endothelial cell glycocalyx dysfunction. *The FASEB J* 28:4686-4699, 2014.
6. Manon-Jensen T et al: Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J* 277:3876-3889, 2010.
7. Tanino Y et al: Syndecan-4 regulates early neutrophil migration and pulmonary inflammation in response to lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47:196-202, 2012.
8. Tanino Y et al: Kinetics of chemokine-glycosaminoglycan interactions control neutrophil migration into the airspaces of the lungs. *J Immunol* 184:2677-2685, 2010.
9. Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis: increased survival with "gastroesophageal reflux therapy": fact or fallacy? *Am J Respir Crit Care Med* 184:1330-1332, 2011.
10. 谷野功典 他 Syndecan-4 は肺線維芽細胞において TGF- β による collagen と α -SMA mRNA 発現亢進を抑制する. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 びまん性肺疾患に関する調査研究班 平成 24 年度研究報告書. 305-314, 2013.
11. Jiang D et al: Inhibition of pulmonary fibrosis in mice by CXCL10 requires glycosaminoglycan binding and syndecan-4. *J Clin Invest* 120:2049-2057, 2010.
12. Echtermeyer F et al: Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest* 107:R9-R14, 2001.
13. Shin J et al: Solution structure of the dimeric cytoplasmic domain of syndecan-4. *Biochemistry* 40:8471-8478, 2001.
14. Lim ST et al: Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C α (PKC α) increases focal adhesion localization of PKC α . *J Biol Chem* 278:13795-13802, 2003.

特発性肺線維症における RAGE (receptor for advanced glycation end-products) の検討

山口 覚博、服部 登、岩本 博志、堀益 靖、益田 武、中島 拓、
大下 慎一郎、藤高 一慶、濱田 泰伸、河野 修興

広島大学大学院医歯薬保健学研究科分子内科学

【はじめに】 The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) は膜 1 回貫通型の受容体蛋白であり、細胞外ドメインで後期糖化生成物 (AGEs)、high mobility group box 1、S100 たんぱく質など多様なリガンドを認識する。RAGE は殆どの正常臓器では発現が乏しいが、例外的に肺においては生理的に高発現しており、肺の恒常性維持に RAGE が関与している可能性が指摘されている。IPF (idiopathic pulmonary fibrosis) 患者では肺組織における RAGE 発現が低下していることが報告されているが、IPF における RAGE のバイオマーカーとしての意義は十分に検討されていない。

【目的】 IPF 患者における RAGE のバイオマーカーとしての有用性を検討すること

【方法】 当院にて加療中の 65 名の IPF 患者と 81 名の健常者の保存血清を用い ELISA 法により血中の可溶性 RAGE (sRAGE) を測定した。IPF 患者と健常者の血清 sRAGE 濃度を比較し、IPF 患者において血清 sRAGE と予後の関連について検討をおこなった。

【結果】 IPF 患者の血清 sRAGE (630.4 ± 275.1 pg/ml) は健常コントロール群 (826.1 ± 338.8 pg/ml) と比較し有意に低値であった ($p < 0.001$)。IPF 患者において 2 年間の予後の判別について ROC 分析からカットオフ値を求め Kaplan-Meier 曲線を用いて検討したところ、sRAGE 低値群 (sRAGE ≤ 628 pg/ml) は高値群に比べて有意に予後不良であった ($p = 0.0047$)。さらに血清 sRAGE 低値は急性増悪発症との有意な関連も認めた ($p = 0.0486$)。

【結論】 IPF 患者では健常者と比較して血中 sRAGE が低下しており、sRAGE 低値は IPF の増悪リスク因子、予後不良因子である可能性が示唆された。

A 研究目的

The receptor for advanced glycation end-product (RAGE) は膜 1 回貫通型の受容体蛋白であり、細胞外の免疫グロブリン様部位で後期糖化生成物 (AGEs)、high mobility group box 1 (HMGB-1)、S100 たんぱく質など多様なリガンドを認識している (1)。リガンドと結合した RAGE は細胞内チロシンキナーゼドメインでシグナル伝達をおこなない炎症反応の亢進や血管内皮機能の障害などに関与していると報告されている。RAGE は殆どの正常臓器では発現が乏しいが、動脈硬化、糖尿病、アルツハイマー病などの病的状態で発現が亢進す

ることが報告されている (2)。

一方興味深いことに RAGE は肺でのみ生理的条件下で高発現しており、肺の恒常性維持との関連が推測されている (3)。当教室と国際共同研究をおこなっているヘルシンキ大学グループは IPF 肺組織のプロテオミクス解析をおこない IPF 肺では健常肺と比較して RAGE の発現が有意に低下していることを報告している (4)。さらに RAGE ノックアウトマウスでは加齢により肺の線維化をきたすことが報告されている (5)。これらの報告から RAGE の低下が IPF の病態生理に関わっていることが示唆されるが、IPF における RAGE のバイ

オマーカーとしての意義は十分に検討されていない。そこで我々は IPF 患者における血中の可溶性 RAGE (sRAGE) を測定し背景因子、急性増悪、予後との関連を明らかにすることを目的として本研究を計画した。

B. 研究方法

対象

本研究は 2001 年 12 月から 2012 年 10 月までに広島大学病院を受診した IPF 患者 65 名と健常コントロール 81 名を対象とした。IPF 患者はいずれも 2011 年の the American Thoracic Society (ATS) /European Respiratory Society (ERS) / Japanese Respiratory Society (JRS) /Latin American Thoracic Association (ALAT) statement の診断基準を満たすものとした (6)。15 名は外科的肺生検で診断し、残り 50 名は definite IPF の基準を満たしていた。健常コントロールは肺機能や胸部単純 X 線写真を施行し、明らかな合併症がないことを確認した。本研究は広島大学病院の倫理委員会ですべての患者より書面による同意に基づくインフォームドコンセントを取得している。

血清 sRAGE の測定

初回診断時に採取した IPF 症例の血清サンプル 65 例と健常コントロールの血清サンプル 81 例は、検体採取後 -80°C で保存した。血清 sRAGE は市販の ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用し測定した。今回使用したキットの検出限界は 78 pg/ml であった。

呼吸機能検査

呼吸機能検査はスパイロメトリー (DISCOM-21FX, CHEST M.I., Inc., Tokyo, Japan) を使用した。

統計解析

結果は他に記載の無い限り中央値 \pm 標準偏差で示した。2 群間の比較ではマンホイットニーの U 検定とカイ 2 乗検定を用い、2 群間の相関は単回帰分析を用いた。2 年生存率の解析を行うにあたり ROC 曲線を用いカットオフ値を設定し、ログ

ランク解析を行った。さらに予後因子を解析するためコックスハザードモデルを用い、単変量解析で有意な予後因子として同定されたものについては多変量解析により背景因子による補正をおこない予後との関連を検討した。解析には JMP statistical software version 11.2.0 (SAS Institute Inc) を使用した。

C. 研究結果

対象の背景因子

IPF 患者は健常コントロールと比較し有意に高齢であり ($p < 0.0001$)、BMI や喫煙歴は IPF 群でコントロール群より有意に高かった ($p < 0.05$)。IPF 群のうち 18 名はピルフェニドンで加療されたことがあり、また 27 名はステロイド単独ないしはステロイドに加えて免疫抑制剤による加療を経験していた。血清 KL-6 は IPF 群で有意な上昇を認めた。呼吸機能検査では % VC が IPF 群で有意に低下していた。また % DL_{CO} は IPF 群のみで測定をおこなった (Table 1)。

ベースラインの血清 sRAGE 濃度について

IPF 患者の血清 sRAGE 濃度 (630.4 ± 275.1 pg/ml) は健常コントロール群 (826.1 ± 338.8 pg/ml) より有意に低下していた ($p < 0.001$) (Figure 1)。

IPF 患者の 2 年生存率を予測する因子としての血清 sRAGE 濃度

ROC 曲線を用いて 2 年生存率を予測する上での血清 sRAGE のカットオフを求めたところ、628.8 pg/ml であった。この ROC 分析の曲線化面積 (AUC) は 0.759 であり、628.8 pg/ml をカットオフとした場合の感度は 59%、特異度は 91%、陽性尤度比は 6.52 であった。

血清 sRAGE 濃度と 2 年生存率の相関について

観察期間の中央値は 22.7 ヶ月であった。ROC 曲線を用いて算出した前述のカットオフを使用し、Kaplan-Meier 曲線を用いて検討したところ、sRAGE 低値群は高値群に比べて有意に予後不良

Table 1 Background characteristics

	control	IPF	p-value
Subjects	81	65	
Age	54.4 ± 2.9	67.7 ± 8.4	<0.0001 ***
Sex, male/female	69/12	51/14	0.2913
BMI, kg/m ²	22.1 ± 1.7	23.2 ± 3.3	0.0269 *
Smoking history			
pack years	17.3 ± 19.0	36.6 ± 35.4	0.0002 **
current/former/never	28/17/36	5/44/16	
KL-6	222.4 ± 75.1	1210.3 ± 627.5	<0.0001 ***
%VC	110.9 ± 16.5	76.0 ± 22.0	<0.0001 ***
%DLco	ND	47.1 ± 15.7	

*: p<0.05, **: p<0.001, ***: p<0.0001 by Mann-Whitney U test

Abbreviations: DLCO: diffusion capacity of carbon monoxide, IPF: idiopathic pulmonary fibrosis, VC: vital capacity

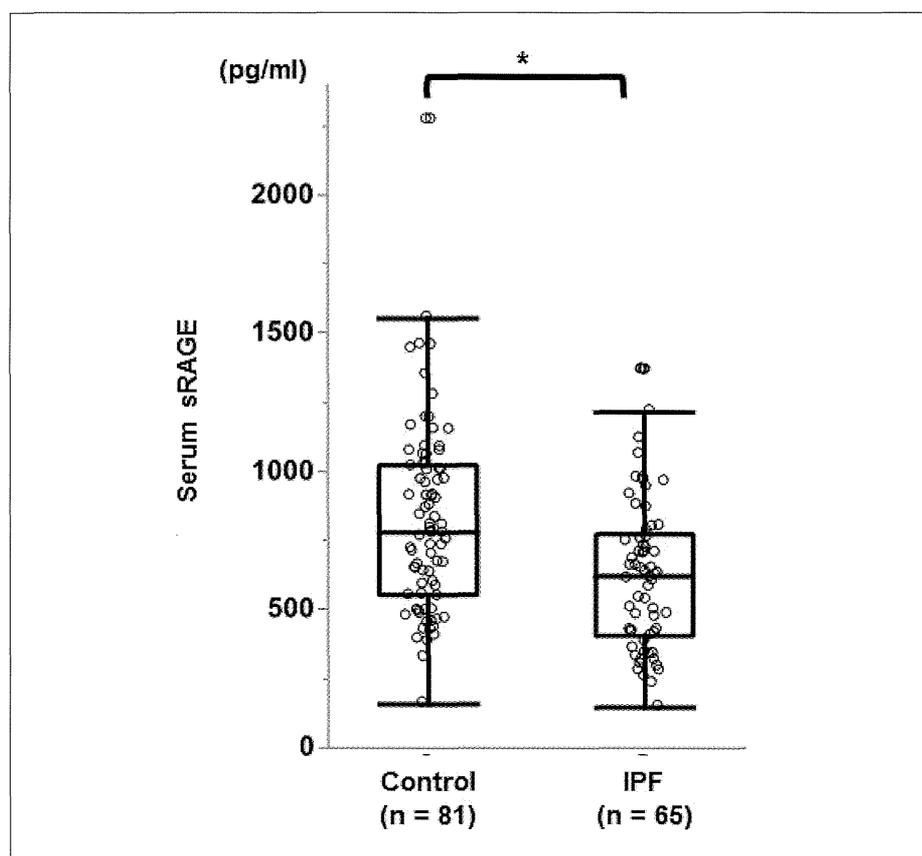


Figure 1 Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE)

* : p <0.001 Mann-Whitney U test Abbreviations: IPF: idiopathic pulmonary fibrosis

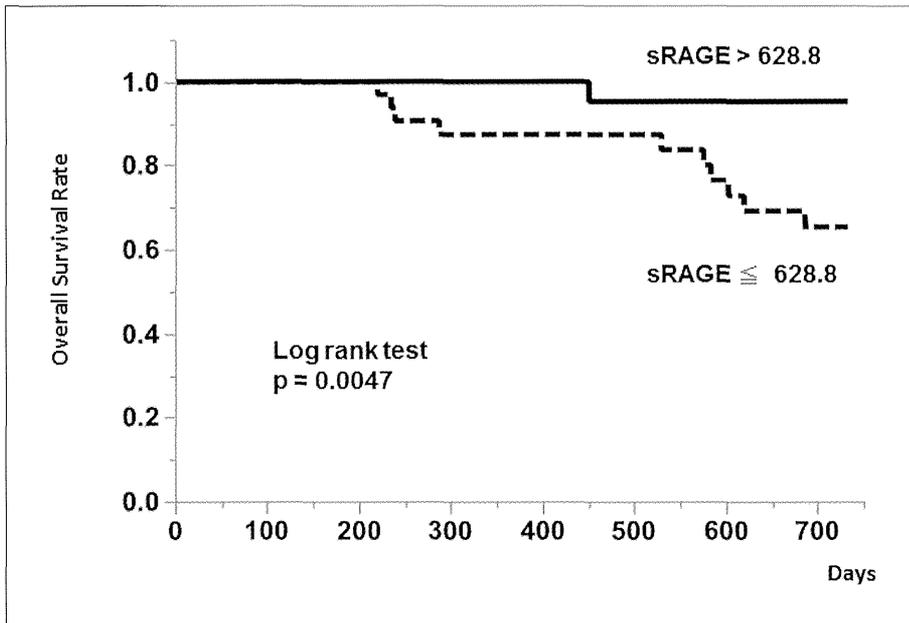


Figure.2 The overall survival of the 65 patients with IPF in relation to the serum sRAGE level

Abbreviations: IPF: idiopathic pulmonary fibrosis sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end-products

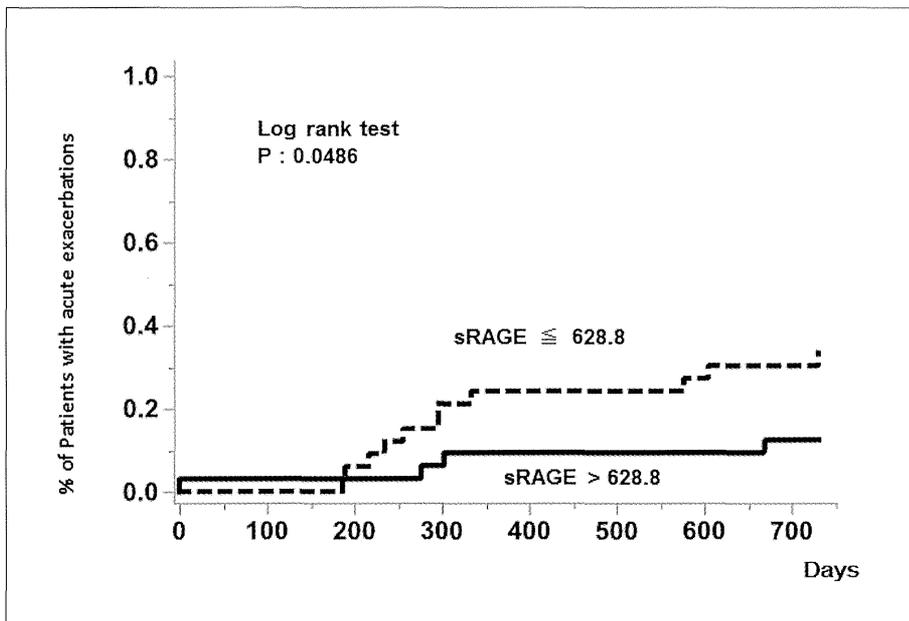


Figure.3 Kaplan-Meier analysis for the onset of acute exacerbation of IPF in relation to the serum sRAGE level.

Abbreviations: IPF: idiopathic pulmonary fibrosis, sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end-products

であった (Figure 2)。コックスハザードモデルを用いて IPF の予後と相関する因子を検討したところ BMI, %VC, %DL_{CO}, ステロイド単独療法もしくはステロイド+免疫抑制薬の併用療法の使用、KL-6, sRAGE (連続変数)、sRAGE (> 628.8 pg/ml) で有意な相関を認めた。さらに多変量解析を用いて年齢、性別、BMI、喫煙歴 (pack years)、ステロイド単独療法もしくはステロイド+免疫抑制薬の併用療法の有無について補正をおこなった上でも、%VC, %DL_{CO}, KL-6, sRAGE (> 628.8 pg/ml)

は予後と有意な相関を認めた (Table 2)。

血清 sRAGE 濃度と肺機能・急性増悪との相関

IPF 患者における初診時の肺機能および経年的肺機能低下と血清 sRAGE 値とは有意な相関を認めなかった (Table 3)。次に血清 RAGE 値と 2 年間の急性増悪発症を Kaplan-Meier 曲線を用いて検討したところ、RAGE 低値群は高値群に比べて有意に急性増悪を多く発症していた (Figure 3)。

Table 2 Univariate and multivariate cox analysis of the overall survival of the 65 patients with IPF

variables	HR	95%CI		p-value	
		下側 95%	上側 95%		
Univariate analysis					
Age	years	0.961	0.897	1.032	0.2751
Sex	male	0.760	0.219	3.483	0.6929
	female	1.000			
BMI	kg/m ²	0.837	0.702	0.992	0.0401
Pack years	(continuous)	0.984	0.96	1.004	0.1234
%VC	(continuous)	0.950	0.911	0.984	0.0025
%Dlco	(continuous)	0.931	0.865	0.984	0.0082
Use of corticosteroid with/without Immune-modulator therapy		17.131	3.272	314.545	0.0002
Use of pirfenidone		1.257	0.273	4.406	0.7418
KL-6	(continuous)	1.002	1.001	1.002	0.0004
sRAGE	(continuous)	0.997	0.994	0.999	0.0291
sRAGE	>628.8	0.127	0.007	0.663	0.0105
Multivariate analysis *					
%VC	(continuous)	0.943	0.877	0.996	0.0342
%Dlco	(continuous)	0.936	0.862	0.990	0.0172
KL-6	(continuous)	1.002	1.001	1.003	0.0021
sRAGE	(continuous)	0.997	0.993	1.0004	0.0990
sRAGE	>628.8	0.063	0.003	0.565	0.0105

* : Adjusted for age, sex, pack years, use of corticosteroid with/without immune-modulator therapy, use of pirfenidone.

Abbreviations: DLCO: diffusion capacity of carbon monoxide, IPF: idiopathic pulmonary fibrosis, sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end-products, VC: vital capacity

Table.3 Correlations of baseline and longitudinal decline of lung function with serum sRAGE levels In IPF patients

Linear regression analysis	Serum sRAGE	
	β	p
VC	-0.0259	0.8416
%VC	-0.05654	0.6625
%DLco	0.145002	0.2863
Δ VC/Y	0.262572	0.0972
Δ %VC/Y	0.283416	0.0847
Δ %DLco/Y	-0.14947	0.3773

Abbreviations: DLCO: diffusion capacity of carbon monoxide, IPF: idiopathic pulmonary fibrosis, sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end-products, VC: vital capacity

D. 考察

本研究は IPF 患者における血中 sRAGE についての初めての検討である。今回の結果から血清 sRAGE は IPF 患者において健常者と比較し低下しており、血清 sRAGE 低値は IPF 患者の予後不良因子、増悪のリスク因子であることが示された。これらの結果から sRAGE は IPF の新たな血清マーカーとして有用である可能性が示唆される。

本研究の結果から血清 sRAGE は、既存の 2 型肺胞上皮由来の血清バイオマーカーである KL-6 と対照的に IPF 患者で低下するという興味深い結果が示された。RAGE は正常肺に高発現しており、とくに 1 型肺胞上皮の血管側に発現することが報告されている (7, 8)。さらにこれまでの *In vitro* の報告から RAGE は肺胞上皮が IV 型コラーゲンなどの細胞外基質に接着し扁平な形態に変化する過程において重要な役割を果たしていることが示されている (7, 9)。このような報告から RAGE は正常肺胞構造の恒常性維持に関与しており、RAGE 発現の低下が IPF における肺胞構造の破壊に関連している可能性が示唆されているが、本研究においても血中の sRAGE は IPF 患者において有意に低下していた。

今回の結果は血清 sRAGE の低下は IPF 患者の急性増悪のリスク因子であり、予後不良因子であることを示している。IPF における予後不良因子として VC、DLCO 低値であることや経年的 VC 低下があることが報告されているが (6, 10)、本研究において血清 RAGE 値はこれら呼吸機能検査の結果と有意な相関を認めなかった。可溶性の sRAGE は細胞内チロシンキナーゼ部位を欠いており、RAGE のリガンドと結合することにより RAGE 受容体のシグナル伝達を妨げることで抗炎症効果作用を有する、すなわち decoy receptor としての機能も有することが報告されている (11)。一方で RAGE のリガンドのうち S100B と HMGB-1 は急性肺傷害との関連が報告されている (12, 13)。S100B は肺胞上皮からの炎症性サイトカイン分泌を促進し sRAGE の投与により抑

制されることが報告されている (12)。マウスに HMGB-1 を気管内投与すると肺胞浮腫と炎症細胞浸潤を来し急性肺傷害に類似した病態を呈することが知られている (13)。Abe らは IPF の急性増悪患者では血中 HMGB-1 が安定期と比較して上昇しており、PMX による血液浄化療法を行うことにより血中 HMGB-1 が低下しており病態の改善に寄与している可能性があることを報告している (14)。このように RAGE のリガンドは IPF の急性増悪の病態形成に関与していることが示唆されており、RAGE とそのリガンドとの関連について今後更なる検討が必要と考えられる。

E. 結論

本研究の結果からは IPF 患者において血清 sRAGE は低下しており、sRAGE の低下は IPF 患者の予後不良、急性増悪のリスク因子であることが示された。

F. 参考文献

1. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001;108 (7) :949-55.
2. Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*. 2008;196 (1) :9-21.
3. Hanford LE, Fattman CL, Shaefer LM, Enghild JJ, Valnickova Z, Oury TD. Regulation of receptor for advanced glycation end products during bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29 (3 Suppl) :S77-81.
4. Ohlmeier S, Mazur W, Salmenkivi K, Myllarniemi M, Bergmann U, Kinnula VL. Proteomic studies on receptor for advanced glycation end product variants in idiopathic pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Proteomics Clin Appl*. 2010;4 (1) :97-105.

5. Englert JM, Hanford LE, Kaminski N, Tobolewski JM, Tan RJ, Fattman CL, et al. A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2008;172 (3) :583-91.
 6. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, 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) :788-824.
 7. Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber EP. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell and tissue research.* 2006;323 (3) :475-88.
 8. Shirasawa M, Fujiwara N, Hirabayashi S, Ohno H, Iida J, Makita K, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms.* 2004;9 (2) :165-74.
 9. Queisser MA, Kouri FM, Konigshoff M, Wygrecka M, Schubert U, Eickelberg O, et al. Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39 (3) :337-45.
 10. du Bois RM, Weycker D, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Kartashov A, et al. Ascertainment of individual risk of mortality for patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2011;184 (4) :459-66.
 11. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Chow WS, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nature medicine.* 1998;4 (9) :1025-31.
 12. Piazza O, Leggiero E, De Benedictis G, Pastore L, Salvatore F, Tufano R, et al. S100B induces the release of pro-inflammatory cytokines in alveolar type I-like cells. *International journal of immunopathology and pharmacology.* 2013;26 (2) :383-91.
 13. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol.* 2000;165 (6):2950-4.
 14. Abe S, Hayashi H, Seo Y, Matsuda K, Kamio K, Saito Y, et al. Reduction in serum high mobility group box-1 level by polymyxin B-immobilized fiber column in patients with idiopathic pulmonary fibrosis with acute exacerbation. *Blood purification.* 2011;32 (4) :310-6.
- G. 健康危惧情報
なし
- H. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Nakagawa M, Hattori N, Haruta Y, Sugiyama A, Iwamoto H, Ishikawa N, Fujitaka K, Murai H, Tanaka J, Kohno N. Effect of increasing respiratory rate on airway resistance and reactance in COPD patients. *Respirology* 2014, in press.
 - 2) Hirashio S, Nakashima A, Doi S, Anno K, Aoki E, Shimamoto A, Yorioka N, Kohno N, Masaki T, Tahara H. Telomeric G-Tail Length and Hospitalization for Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014, in press.
 - 3) Kubota M, Nakanishi S, Hirano M, Maeda S, Yoneda M, Awaya T, Yamane K, Kohno N. Relationship between serum cholesterol efflux capacity and glucose intolerance in Japanese-Americans. *J Atheroscler Thromb.* 2014; 21 (10) : 1087-1097.

- 4) Ohshimo S, Ishikawa N, Horimasu Y, Hattori N, Hirohashi N, Tanigawa K, Kohno N, Bonella F, Guzman J, Costabel U. Baseline KL-6 Predicts Increased Risk for Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respir Med* 2014; 108 : 1031-1039.
- 5) Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Tanaka S, Bonella F, Ohshimo S, Guzman J, Costabel U, Kohno N. Differences in serum SP-D levels between German and Japanese subjects are associated with SFTPD gene polymorphisms. *BMC Med Genet* 2014; 15 (1) : 4.
- 6) Doi T, Doi S, Nakashima A, Ueno T, Yokoyama Y, Kohno N, Masaki T. Mizoribine ameliorates renal injury and hypertension along with the attenuation of renal caspase-1 expression in aldosterone-salt-treated rats. *PLoS One* 2014; 9 (4) : e93513.
- 7) Hiragun M, Hiragun T, Ishii K, Suzuki H, Tanaka A, Yanase Y, Mihara S, Haruta Y, Kohno N, Hide M. Elevated serum IgE against MGL_1304 in patients with atopic dermatitis and cholinergic urticaria. *Allergol Int* 2014; 63 (1) : 83-93
3. Iwamoto H, Horimasu Y, Nakashima T, Ohshimo S, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Hattori N, Mazur Fujitaka K, Haruta Y, Murai, Kohno N. Decreased circulatory receptor for advanced glycation end-products is associated with poorer survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. ERS International Congress 2014
4. Horimasu Y, Ishikawa N, Nakashima T, Iwamoto H, Senoo T, Ohshimo S, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Hattori N, Kohno N. Annual changes in pulmonary function are independent prognostic factors for the patients with chronic hypersensitivity pneumonia. ERS International Congress 2014

2. 学会発表

1. Ohshimo S, Ishikawa N, Horimasu Y, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Hattori N, Bonella F, Guzman J, Costabel U, Kohno N. Impact Of Ethnic Difference And TERT Gene Polymorphisms In The Acute Exacerbation Of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. ATS 2014 International Conference
2. Ishikawa N, Horimasu Y, Ohshimo S, Takayama Y, Masuda T, Hattori N, Kohno N. Gene Expression Profiles Of Idiopathic Interstitial Pneumonias: Molecular Signatures Of Pulmonary Fibrosis. ATS 2014 International Conference

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし.
2. 実用新案登録
なし.
3. その他
なし.

特発性肺線維症における WNT / β -catenin シグナルの関与

小田 桂士¹、石本 裕士¹、迎 寛^{1*}、和泉 弘人²、山田 壮亮³

1 産業医科大学 呼吸器内科 2 産業医科大学 産業生態科学研究所

3 産業医科大学 第二病理学

*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】 WNT / β -catenin シグナルは生体内で細胞の分化・増殖に関与し、肺内における線維化においても重要な役割を担っているが、リガンドの1つである WNT10A については知見がなかった。今回、我々は特発性肺線維症 (IPF) における WNT10A の役割と IPF 患者における発現意義について検討を行った。

【対象・方法】 ブレオマイシン肺臓炎モデルマウスと fibroblast cell (IMR-90, LL97A) を用いて、WNT10A とブレオマイシンおよび TGF- β 1 の関連性について検討した。さらに、外科的肺生検によって診断された IPF 患者 (30 名) に対し WNT10A 発現が予後に与える影響とその死亡原因について解析を行った。

【結果】 ブレオマイシン肺臓炎モデルマウスでは、WNT10A および TGF- β 1 の発現が誘導された。特に WNT10A は fibroblast cell で発現していた。また fibroblast cell (IMR-90, LL97A) に対し、TGF- β 1 (5ng/ml) による刺激を行うと、WNT10A と細胞外基質である collagen 産生が強く誘導された。一方、WNT10AsiRNA を導入することで collagen 産生は抑制された。IPF 患者では、fibroblastic foci に一定の割合で WNT10A 発現が確認された患者群では、明らかに予後が悪く (Hazard ratio 5.351, p=0.0041)、WNT10A 発現は急性増悪発症の危険因子であった (Odds ratio 13.69, p=0.013)。

【結論】 IPF において WNT10A は線維芽細胞における分化・増殖に関与し、病態の進行を誘導しているだけでなく、急性増悪の発症にも関与している。

A. 研究目的

特発性肺線維症 (IPF) は原因不明の緩徐進行性線維化疾患であり、有効な治療法は限られている (1, 2)。死亡原因は急性増悪が最も多く (3)、国際的にもその存在は認知されている (4)。しかし、急性増悪の診断は難しく、ステロイド治療や免疫抑制剤による治療は、時に日和見感染症を引き起こすため (5)、メカニズムの解明や急性増悪を事前に把握できるようなバイオマーカーが期待されていた。

我々の共同研究室では、以前より細胞の分化・増殖という観点で WNT / β -catenin シグナルに注目し、特に ligand の1つである WNT10A を過

剰発現させることで細胞増殖が強く誘導されることを報告してきた (6)。今回、我々は IPF における線維化と WNT / β -catenin シグナルの関与について検討を行った。

B. 研究方法

まず C57BL/6 を用いて、ブレオマイシン肺臓炎モデルマウスを作成し、肺内における WNT10A の発現局在について調べた。さらにヒト線維芽細胞 (LL97A, IMR-90) を用いて、TGF- β 1 と WNT10A の関連性について検討を行った。また、外科的肺生検で UIP (Usual Interstitial Pneumonia) の組織診断が得られた IPF 患者 30

名を対象とし、WNT10A の免疫染色を行うことで、WNT10A 発現と予後との関連について検討を行った (倫理委員会番号：H26-004)。

C. 研究結果

C57BL/6 を用いたブレオマイシン肺臓炎モデルマウスでは、線維芽細胞に WNT10A が強く発現していることを確認した (Figure 1)。また、ヒト線維芽細胞 (LL97A, IMR-90) に対し TGF- β 1 (5ng/ml) で刺激を行ったところ、WNT family のうち WNT10A が最も強く誘導され、転写調節領域での活性も確認された (Figure 2)。さらに SiRNA で特異的に WNT10A の発現を阻害するこ

とで、細胞外基質の産生が抑制された (data not shown)。

IPF 患者における肺組織の WNT10A の免疫染色では、*in vivo* の実験と同様に線維芽細胞に発現が確認されたが、染色程度は個々の症例によって異なっていた。そのため、染色程度により、陽性群と陰性群の 2 群に分けた (Figure 3)。Table 1 に示すように両群において患者背景の差は認めなかったが、WNT10A 陽性群では、明らかに予後不良であり (Hazard ratio 5.351, $p=0.0041$) (Figure 4)、急性増悪の発生と関連していた (Odds ratio 13.69, $p=0.013$)。

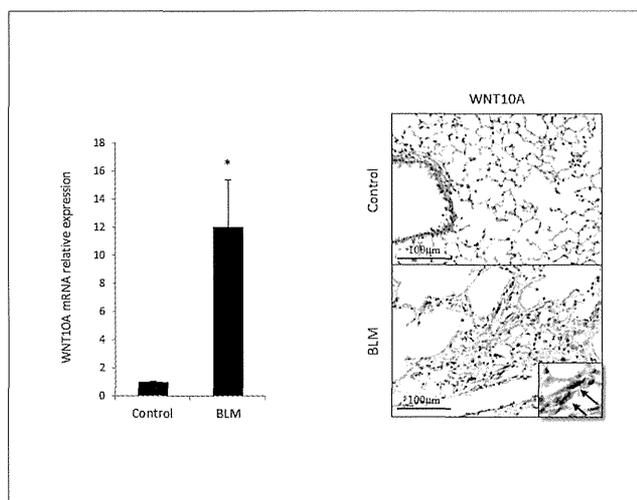


Figure 1. プレオマイシン肺臓炎モデルマウスにおける WNT10A の発現

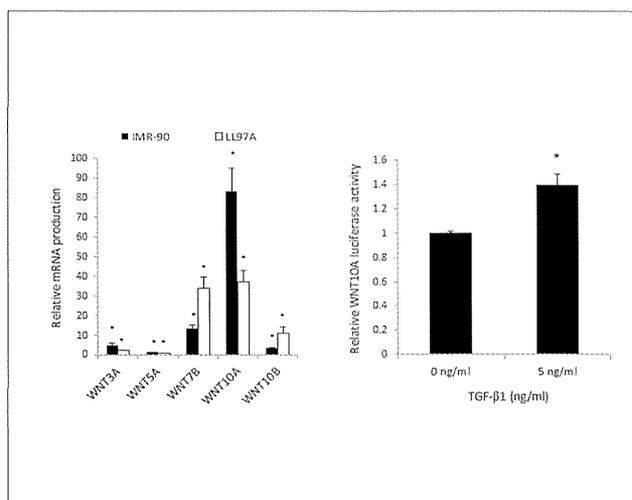


Figure 2. ヒト線維芽細胞における TGF- β 1 による WNT10A の発現

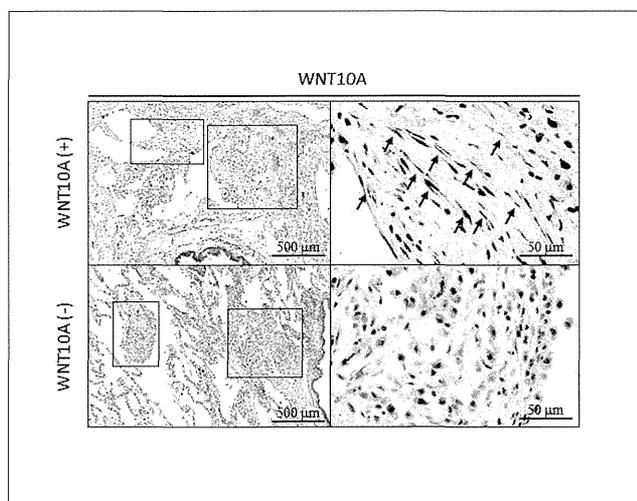


Figure 3. 外科的肺生検における WNT10A 免疫染色

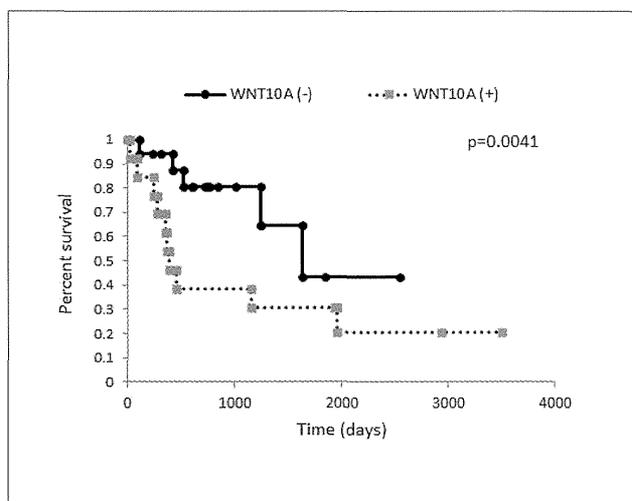


Figure 4. WNT10A 発現による生存曲線の比較

Table 1. 本研究における患者背景 (WNT10A 陽性群と陰性群)

Characteristic	Positive Group (n=13)	Negative Group (n=17)	p value
Sex, male, No	11	14	0.782
Age, year, mean	70	71.2	0.711
Brinkman Index, mean	856.9	943.8	0.773
BMI, kg/m ² , mean	24.9	22.3	0.103
PaO ₂ , Torr, mean	80.5	85.2	0.363
SpO ₂ , %, mean	97.6	96.9	0.263
FVC, L, mean	2.79	2.88	0.651
%FVC, %, mean	87.3	86.7	0.934
FEV1.0%, %, mean	73.3	75.3	0.967
%DLCO, %, mean	63.3	65.2	0.662
KL-6, U/ml, mean	1016.6	747.2	0.563
SP-D, ng/ml, mean	168.4	157.7	0.779
LDH, IU/L, mean	235.7	222.5	0.934
MMRC, mean	1.15	1.35	0.509

D. 考察

我々は、WNT10A が線維芽細胞に発現し、TGF- β 1 の刺激によって細胞外基質の産生を調整していることを示した。また、IPF 患者では WNT10A の発現は、予後に関与しているだけでなく、急性増悪発症のリスク因子であることを示した。

IPF では、肺胞上皮細胞が線維芽細胞や筋線維芽細胞に形質転換する上皮間葉系移行 (epithelial mesenchymal transition : EMT) が重要であり、活性化した線維芽細胞が、細胞外基質を大量に産生することで最終的に呼吸不全に陥るとされている (7)。TGF- β は EMT における重要な増殖因子であり、シグナル伝達分子である Smad 依存性経路を介し (8)、様々な生物学的効果を制御するだけでなく、細胞状態に特異的な転写調節を行うとされている。しかし、一方で Smad 非依存性経路の存在も知られており (9)、近年、TGF- β による WNT/ β -catenin シグナルを介した線維化が報告された (10)。

WNT の ligand である WNT10A は、細胞増殖を中心とした多くの機能を有していることが報告されており (11, 12)、我々の共同研究室でも肺以外の他臓器における線維化に関与していることを報告してきた (6, 13)。今回、IPF においても同

様に線維化に関与していることが明らかになり、WNT/ β -catenin シグナルの特異的な阻害は創薬につながるものと考えられる。

参考文献

1. Flaherty KR, Toews GB, Travis WD, Colby TV, Kazerooni EA, Gross BH, Jain A, Strawderman RL, Paine R, Flint A, Lynch JP, Martinez FJ. Clinical significance of histological classification of idiopathic interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 2002; 19: 275-283.
2. King TE, Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV, Waldron JA, Flint A, Thurlbeck W, Cherniack RM. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1025-1032.
3. Natsuzaka M, Chiba H, Kuronuma K, Otsuka M, Kudo K, Mori M, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi H. Epidemiologic survey of Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis and investigation of ethnic differences. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190: 773-779.

4. Collard HR, Moore BB, Flaherty KR, Brown KK, Kaner RJ, King TE, Lasky JA, Loyd JE, Noth I, Olman MA, Raghu G, Roman J, Ryu JH, Zisman DA, Hunninghake GW, Colby TV, Egan JJ, Hansell DM, Johkoh T, Kaminski N, Kim DS, Kondoh Y, Lynch DA, Müller-Quernheim J, Myers JL, Nicholson AG, Selman M, Toews GB, Wells AU, Martinez FJ, Investigators IPFCRN. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 636-643.
5. Oda K, Ishimoto H, Yamada S, Kushima H, Ishii H, Imanaga T, Harada T, Ishimatsu Y, Matsumoto N, Naito K, Yatera K, Nakazato M, Kadota JI, Watanabe K, Kohno S, Mukae H. Autopsy analyses in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2014; 15: 109.
6. Yasuniwa Y, Izumi H, Wang KY, Shimajiri S, Sasaguri Y, Kawai K, Kasai H, Shimada T, Miyake K, Kashiwagi E, Hirano G, Kidani A, Akiyama M, Han B, Wu Y, Ieiri I, Higuchi S, Kohno K. Circadian disruption accelerates tumor growth and angio/stromagenesis through a Wnt signaling pathway. *PLoS One* 2010; 5: e15330.
7. Yamashita M, Yamauchi K, Chiba R, Iwama N, Date F, Shibata N, Kumagai H, Risteli J, Sato S, Takahashi T, Ono M. The definition of fibrogenic processes in fibroblastic foci of idiopathic pulmonary fibrosis based on morphometric quantification of extracellular matrices. *Hum Pathol* 2009; 40: 1278-1287.
8. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700.
9. Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 2005; 118: 3573-3584.
10. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, Horn A, Kireva T, Beyer C, Zwerina J, Schneider H, Sadowski A, Riener MO, MacDougald OA, Distler O, Schett G, Distler JH. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Commun* 2012; 3: 735.
11. Feng C, Xu Z, Li Z, Zhang D, Liu Q, Lu L. Down-regulation of Wnt10a by RNA interference inhibits proliferation and promotes apoptosis in mouse embryonic palatal mesenchymal cells through Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Physiol Biochem* 2013; 69: 855-863.
12. Liu Y, Han D, Wang L, Feng H. Down-regulation of Wnt10a affects odontogenesis and proliferation in mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 434: 717-721.
13. Kuma A, Yamada S, Wang KY, Kitamura N, Yamaguchi T, Iwai Y, Izumi H, Tamura M, Otsuji Y, Kohno K. Role of WNT10A-Expressing Kidney Fibroblasts in Acute Interstitial Nephritis. *PLoS One* 2014; 9: e103240.