

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

加藤 元康

順天堂大学大学院 医学研究科 呼吸器内科

加藤 元康<sup>1</sup>、高橋 史行<sup>1</sup>、佐藤 匡<sup>1</sup>、佐々木 洋子<sup>2</sup>、林 秀美<sup>2</sup>、畑 幸江<sup>2</sup>、吉岡 泰子<sup>1</sup>、  
守尾 嘉晃<sup>1</sup>、佐々木 信一<sup>1</sup>、瀬山 邦明<sup>1</sup>、丹羽 眞一郎<sup>2,3</sup>、佐谷 秀行<sup>3</sup>、高橋 和久<sup>1\*</sup>

1 順天堂大学大学院医学研究科呼吸器内科      2 リンクジェノミクス

3 慶應義塾大学大学院先端医学研究科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

## 【要旨】

特発性肺線維症 (IPF) は肺において高度の線維化が進行し、確立した治療法がない難治性疾患である。近年、肺線維化において、上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition; EMT) の重要性が示唆されている。我々は抗アレルギー薬である Tranilast に着目し、EMT 阻害及び肺線維化の抑制効果を検討した。ヒト肺胞上皮細胞株である A549 を TGF  $\beta$  2 で刺激し EMT を誘導した。更に Tranilast を添加、48 時間後に RNA 及びタンパクを抽出し、EMT 阻害効果を上皮系、間葉系マーカーを用いて検討した。Tranilast は A549 細胞において TGF  $\beta$  2 誘導性 EMT による上皮系マーカーである E-cadherin の発現消失を改善し、間葉系マーカーである N-cadherin の発現、細胞外マトリックスの産生増加、TGF2 誘導性 Smad2, 3 のリン酸化、および TGF  $\beta$  -Smad 経路の下流にある転写因子の抑制を確認した。また Wound Healing Assay で細胞遊走能の検討を行い Tranilast による抑制を確認した。マウスへの Bleomycin 経静脈的投与により肺線維症モデルを作成し、Tranilast 経口投与による肺線維化の抑制効果を病理学的に評価、肺含有コラーゲン量を確認したところ Tranilast は線維化やコラーゲン増加を抑制し、免疫組織染色における Fibronectin の抑制、western blot 法によりリン酸化 Smad2 の発現も抑制した。Tranilast は TGF  $\beta$  2 誘導性の EMT に伴う細胞外マトリックス産生を抑制することより、IPF 治療に有用である可能性が示唆された。引き続き薬剤の EMT、及び線維化抑制のメカニズムに関して解析を進めている。

【背景・目的】 特発性肺線維症 (IPF) は肺において高度の線維化が進行し、確立した治療法がない原因不明の難治性疾患であり [1]、近年、IPF の肺線維化病態において上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition; EMT) の重要性が示唆さ

れている [2] [3] [4] [5]。我々は抗アレルギー薬として日常診療に使用され、最近では腎線維症における線維化抑制効果も報告されている Tranilast に着目し [6]、その EMT 阻害及び肺の線維化抑制効果を検討した。

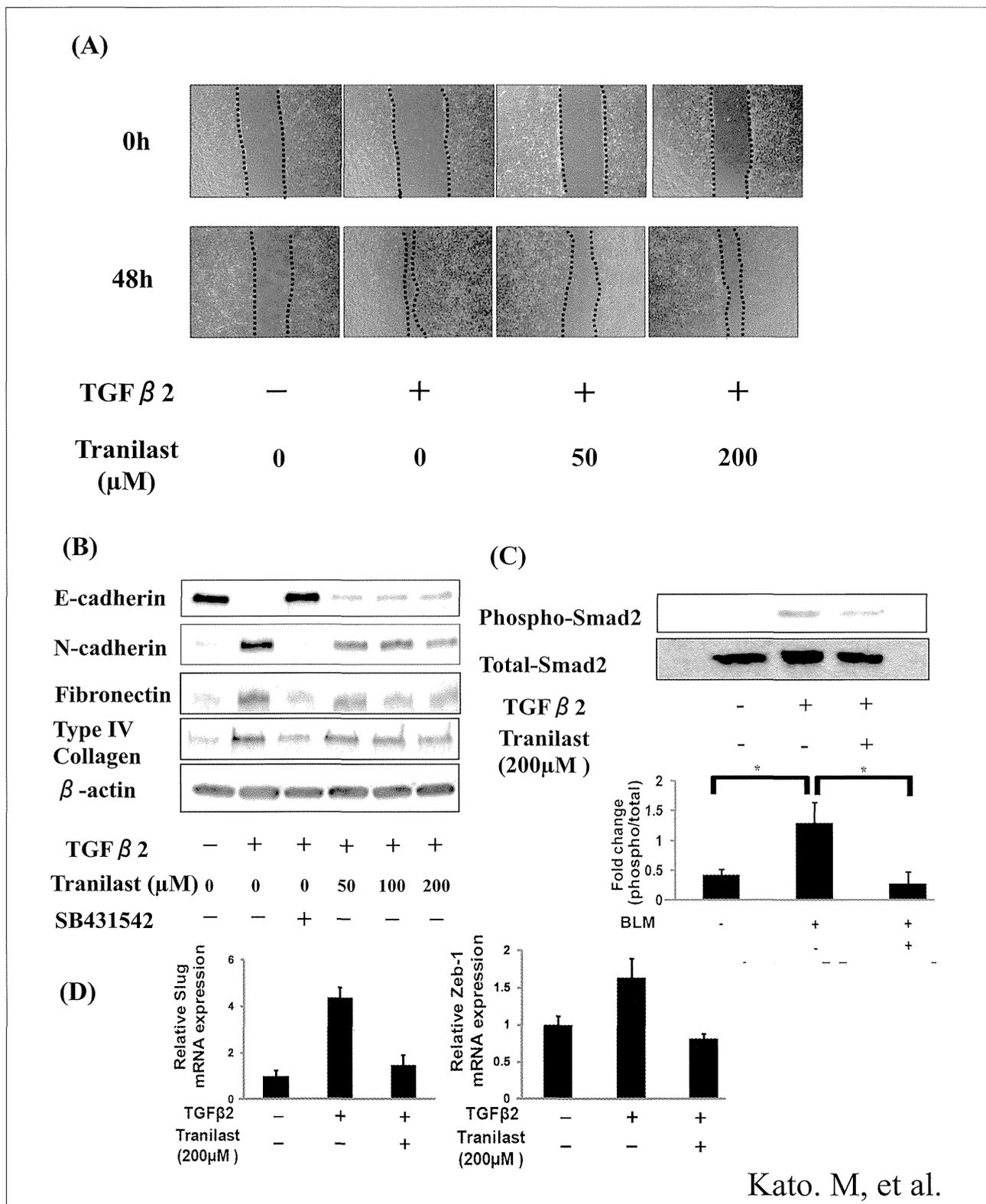


Figure.1

(A) A sterile plastic micropipette tip was used to make a wound by scratching a monolayer of A549 cells. Migration of cells into the wound area was analyzed by microscopy after 48 hours from scratching. Treatment of tranilast significantly inhibited wound healing at a dose of 100 $\mu$ M.

(B) A549 cells were stimulated with TGF  $\beta$  2 (5 ng/ml) in the presence of DMSO, tranilast (50-200  $\mu$  M), or SB431542 (5  $\mu$  M) for 48 hours and the lysates were blotted for E-cadherin, N-cadherin, fibronectin, and type IV collagen.  $\beta$  -actin was used as loading control.

(C) A549 cells were treated without or with TGF  $\beta$  2 (5 ng/ml) in combination of DMSO (-), or tranilast (200  $\mu$  M) for 30 minutes. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies to phospho-Smad2 and Smad2.

(D) A549 cells were also stimulated without or with TGF  $\beta$  2 (5 ng/ml) in combination of DMSO (-), or tranilast (200  $\mu$  M) for 2 hours. TGF  $\beta$  2-induced expression of transcriptional factors were significantly suppressed by the treatment with tranilast.

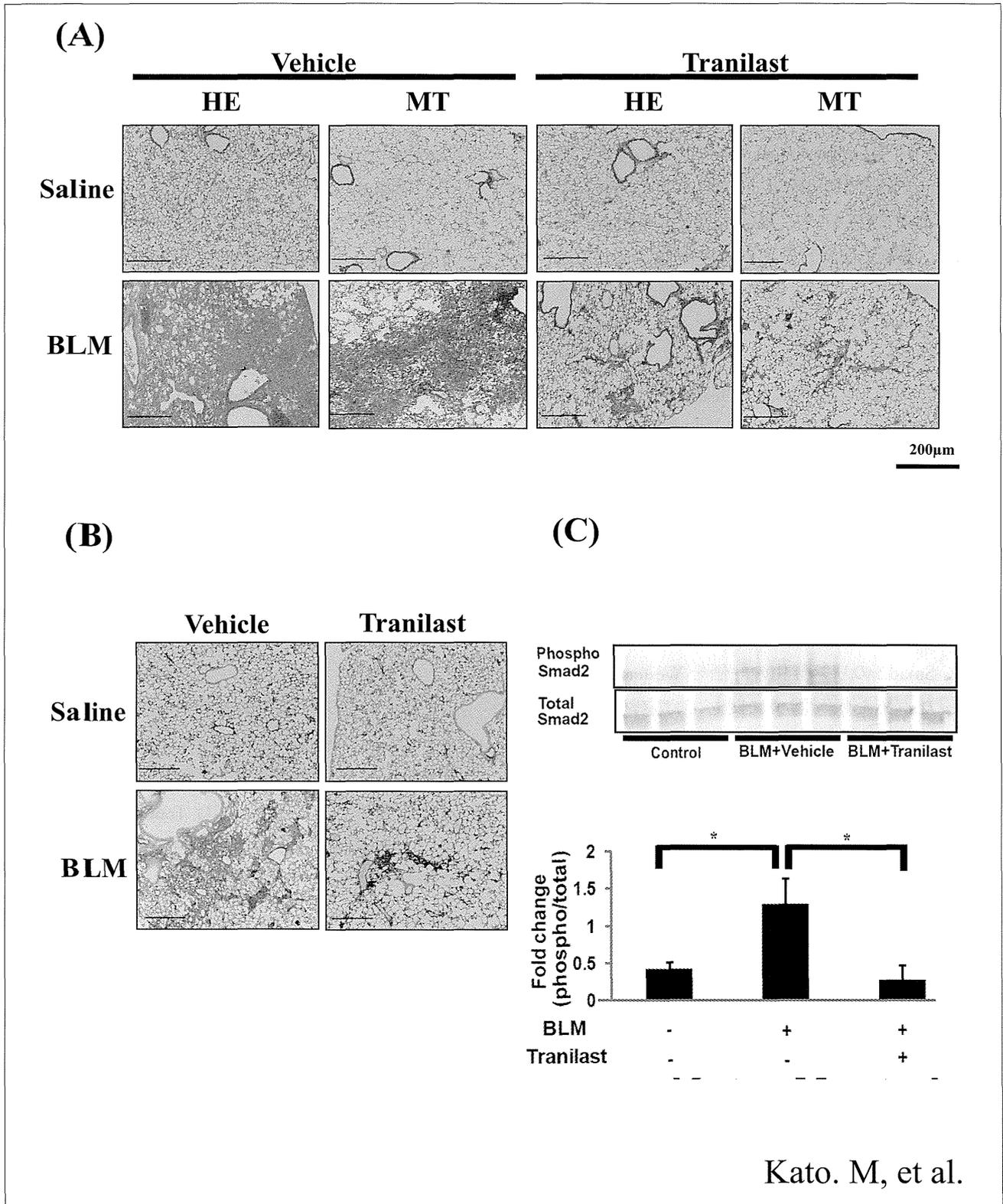


Figure.2

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

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

(C) Protein levels of phospho-Smad2 and total-Smad2 in the whole lung lysates of mice after the instillation of BLM or saline from 22 days.

## 【方法】

### ・A549 による EMT 誘導モデル

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

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

Tranilast 投与 48 時間後に mRNA 及びタンパクを抽出し、EMT 阻害効果を上皮系、間葉系マーカーの定量的 PCR、Western blot 法、及び免疫蛍光細胞染色で確認した。また Tranilast の標的探索として Smad2 のリン酸化の評価を Western blot 法で行った。また転写因子に関しては定量的 PCR 法で発現有無の確認を行った。

### ・ブレオマイシン肺線維症モデル

12 週齢の ICR オスマウスを使用した。ブレオマイシン (BLM) 10mg/kg を生理食塩水で溶解し、尾静脈より 5 日間連続で経静脈的に投与した [7]。Tranilast (400mg/kg) の経口投与は経口ゾンデを用いて、BLM 投与開始日から 8 日目より 20 日目まで投与し、22 日目に検体を採取した。摘出した肺組織は、病理標本作製、コラーゲン含有量の測定、及びタンパク抽出に用いた。病理学的評価としてはヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、マッソン・トリクローム (MT) 染色を行い、Ashcroft score [8] によりスコア化した。肺でのコラーゲン含有量の測定は Sircol Collagen Assay を用いて行った。Fibronectin による免疫組織染色においても評価を行った。また採取した肺をホモジナイズ、およびタンパクを抽出して、western blot 法により Smad2,3 リン酸化の評価を行った。

## 【結果】

### ・A549 による EMT 誘導モデルでの評価

遊走能の抑制効果を Wound Healing Assay により確認した。EMT により亢進した細胞遊走能は Tranilast 100 $\mu$ M 以上で抑制されることを確認した。(Figure. 1A)

また EMT マーカーの評価を Western blot 法等で行った。Tranilast は A549 細胞において TGF  $\beta$  2 誘導性 EMT による上皮系マーカーである E-cadherin の発現消失を改善すること、間葉系マーカーである N-cadherin の発現、及び細胞外マトリックス (Fibronectin、IV 型コラーゲン) の産生増加を著明に抑制することを確認した (Figure. 1B)。TGF  $\beta$  2 刺激 24 時間後による Tranilast の添加での各マーカーの評価も行い、TGF  $\beta$  2 と Tranilast 同時刺激と同等の結果を得た。また TGF2 誘導性 Smad2 のリン酸化 (Figure. 1C)、転写因子である TGF  $\beta$  誘導性の ZEB-1、Slug 発現も抑制した (Figure.1D)。

### ・ブレオマイシン肺線維症モデルでの評価

Tranilast の肺線維化抑制効果について病理学的に Ashcroft score を用いて評価した。BLM 投与によって増加する線維化病変は Tranilast により改善した。(Figure. 2A) また BLM 投与により増加する肺含有コラーゲン量を Tranilast は抑制し、免疫組織染色における Fibronectin の発現抑制 (Figure. 2B)、肺から抽出したタンパクでの Smad2、Smad3 のリン酸化抑制 (Figure. 2C) を確認した。

## 【結論】

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

【参考文献】

1. Raghu, G., et al., *An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. 183 (6) : p. 788-824.
2. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. 139 (5) : p. 871-90.
3. Harada, T., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in human lungs with usual interstitial pneumonia: quantitative immunohistochemistry*. Pathol Int, 2010. 60 (1) : p. 14-21.
4. Willis, B.C., R.M. duBois, and Z. Borok, *Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung*. Proc Am Thorac Soc, 2006. 3 (4) : p. 377-82.
5. Willis, B.C., et al., *Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1*. The American Journal of Pathology, 2005. 166 (5) : p. 1321-1332.
6. Qi, W., et al., *Tranilast attenuates connective tissue growth factor-induced extracellular matrix accumulation in renal cells*. Kidney Int, 2006. 69 (6) : p. 989-95.
7. Oku, H., et al., *Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis*. Eur J Pharmacol, 2008. 590 (1-3) : p. 400-8.
8. Ashcroft, T., J.M. Simpson, and V. Timbrell, *Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale*. J Clin Pathol, 1988. 41 (4) : p. 467-70.

【学会発表】

- Kato M, Takahashi F, Sato T, Ko R, Yagishita S, Nurwidya F, Kobayashi I, Hoshika Y, Murakami A, Yoshioka M, Shimada N, Yoshioka Y, Takahashi M, Saya H, Takahashi K.
- Dasatinib suppresses TGF  $\beta$  -induced epithelial mesenchymal transition and inhibits pulmonary fibrosis.
- Congress of European respiratory society (ERS) 2014

# PINK1-Parkin 系によるマイトファジー制御の 肺線維化進展における役割の検討

研究分担者（所属研究機関における職名）

小林 賢司（大学院）、荒屋 潤（准教授）、原 弘道（講師）、皆川 俊介（助教）、  
佐藤 奈穂子（助教）、吉田 昌弘（大学院）、栗田 裕輔（大学院）、伊藤 三郎（大学院）、  
高坂 直樹（助教）、藤井 さと子（助教）、小島 淳（助教）、清水 健一郎（助教）、  
沼田 尊功（助教）、河石 真（助教）、金子 由美（助教）、中山 勝敏（准教授）、  
桑野 和善（教授）

東京慈恵会医科大学 内科学講座呼吸器内科

研究協力者 桑野 和善

東京慈恵会医科大学 内科学講座呼吸器内科 教授

## 研究要旨

**【目的】** 細胞外基質を産生し収縮能を有する筋線維芽細胞の増加は、特発性肺線維症（IPF）の病態形成に重要な役割を果たしている。筋線維芽細胞への分化には細胞内活性酸素種（ROS）による細胞内シグナル伝達系の活性化が関与し、一方、細胞内 ROS はミトコンドリア特異的オートファジー、マイトファジーにより制御される。そこで、本研究では、PINK1-Parkin によるマイトファジーが、ミトコンドリア由来 ROS と筋線維芽細胞分化の制御に果たす役割について検討した。

**【方法】** ヒト肺線維芽細胞を用いて検討した。PINK1, Parkin のノックダウンによりマイトファジーを阻害した。抗酸化剤として N-acetylcysteine (NAC), MitoTEMPO を用いた。筋線維芽細胞分化、PDGF 受容体 -PI3K-Akt 経路の活性化は、ウェスタンブロッティングにて検討した。ROS の産生は、DCFH-DA assay と MitoSOX Red 染色で評価した。

**【結果】** PINK1, Parkin のノックダウンによりミトコンドリア由来 ROS の産生は増加し、PDGF 受容体 -PI3K-Akt 経路が活性化して、筋線維芽細胞への分化が誘導された。NAC, MitoTEMPO, PDGF 受容体阻害剤, 及び PI3K-Akt 阻害剤は、マイトファジー阻害による筋線維芽細胞分化を抑制した。

**【結論】** PINK1-Parkin 系によるマイトファジーの低下は、ミトコンドリア由来 ROS の増加により、PDGF 受容体 -PI3K-Akt 経路の活性化を介して筋線維芽細胞分化を誘導した。

## 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。喫煙や加齢、環境曝露等がリスクファクターと考えられているが、現時点では病因、病態の詳細は明らかとなっていない。治療には、ステロイド剤、免疫抑制剤、

近年では、N-acetylcysteine (NAC), pirfenidone, BIBF1120 (Nintedanib) 等が試みられているが、効果は限定的であり、病態のさらなる解明と新規治療薬の開発は急務である。

IPF の主要な病態は、上皮細胞の損傷とそれに続く修復・治癒機転の異常による過剰な線維化の進展と考えられている。細胞外基質の過剰産生と

強い収縮能を特徴とする筋線維芽細胞の集簇からなる fibroblastic foci (FF) の形成が、病理学的特徴である。FF の形成は肺機能や予後と相関し、IPF の病態進展に重要な役割を果たしている。その形成機序、つまり筋線維芽細胞の由来や分化誘導の機序の解明は、IPF の病態を明らかにする上で重要と考えられる。さらに動物モデルでは、筋線維芽細胞分化の制御が肺線維化進展を抑制するとの報告があり、筋線維芽細胞分化誘導の分子機構の解明は、IPF の新たな治療法開発の手がかりとなると考えられる。

筋線維芽細胞分化には、シグナル分子としての活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) が重要な役割を果たしていることが報告されている。しかしながら、細胞内 ROS の由来と制御機構の詳細は、十分には解明されていない。ROS は、NADPH オキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ミトコンドリア呼吸鎖酵素などによって細胞内の様々な部位で産生されるが、なかでもミトコンドリアは主要な産生源である。そこで、我々はミトコンドリア由来の ROS、更にはその制御機構が筋線維芽細胞分化に関与している可能性を考えた。

ミトコンドリアは、エネルギーである ATP を合成する際に副産物として、ROS を産生する。さまざまな刺激によりミトコンドリアが傷害を受けると、ROS 産生は増加する。過剰な ROS は細胞内の恒常性維持機構の破綻をもたらすため、傷害ミトコンドリアは適切に処理される必要がある。オートファジーと呼ばれる細胞内の分解処理機構は、傷害ミトコンドリアを分解除去しミトコンドリアの品質管理と ROS 産生を制御する。ミトコンドリア選択的オートファジーは、マイトファジーと呼ばれ、その分子機構は近年明らかとなりつつある。傷害ミトコンドリア膜上で PINK1 が安定化し、E3 ユビキチンリガーゼである Parkin を細胞質からミトコンドリア膜上へリクルートする。そして、Parkin によりユビキチン化された傷害ミトコンドリアはアダプター蛋白である p62 を介してオートファゴソームで分解処理される。マイトファジーの一部はこの PINK1-

Parkin 経路により制御されている。

以上より、我々は、マイトファジーが、ミトコンドリア ROS による細胞内シグナル伝達を調整し、筋線維芽細胞分化を制御している可能性を考えた。これまで、我々は、IPF 肺組織において、オートファジー活性が不十分であることが筋線維芽細胞への分化を誘導し、病態と関連する可能性を明らかにしている。本年度はオートファジーの中でも特にマイトファジーの重要性を明らかにすることを目的に検討を行った。

## 対象と方法

### 分離ヒト肺線維芽細胞を用いた検討

肺癌手術検体の正常部分より分離培養したヒト肺線維芽細胞を用いて検討を行った。PINK1, Parkin のノックダウンにより、特異的にマイトファジーを阻害した。抗酸化剤として、N-acetylcysteine (NAC) とミトコンドリア特異的な抗酸化剤である MitoTEMPO を用いた。platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), fibroblast growth factor receptor (FGFR), vascular epidermal growth factor receptor (VEGFR), PI3K-Akt シグナルには、それぞれ特異的な阻害剤を使用した。筋線維芽細胞への分化は  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) と type I collagen の発現により評価した。PDGF 受容体-PI3K-Akt 経路の活性化は western blotting で評価した。細胞全体の ROS 産生は DCFH-DA assay で、ミトコンドリア由来の superoxide は MitoSOX Red 染色で評価した。

### (倫理面への配慮)

本研究で用いたヒト肺線維芽細胞は、東京慈恵会医科大学附属病院で肺葉切除術を施行された肺の一部より分離・培養を行って得たものである。当大学倫理委員会での承認を得た研究であり、術前に全例研究参加・検体提供への説明と同意を書面にて行った。当大学の患者個人情報保護のマニュアルに従って検体保存や使用を行った。

## 結果

### 1. ミトファジーは ROS 産生を制御する。

まず、我々は、ミトファジーが細胞内 ROS 産生を制御していることを確認した。PINK1, Parkin のノックダウンによりミトファジーを抑制し、細胞内および、ミトコンドリア由来 ROS への影響を検討した。PINK1, Parkin いずれのノックダウンによっても細胞内 ROS (DCFH-DA assay)、ミトコンドリア由来 ROS (MitoSOX Red 染色) がいずれも増加した。ミトファジーは ROS 産生に対し抑制的に作用しており、ミトファジーが低下すると、傷害ミトコンドリアが蓄積し、ROS が増加すると考えられた。

### 2. ミトファジーは、PDGF 受容体 -PI3K-Akt 経路を介した筋線維芽細胞分化を制御する。

次に、ミトファジーによる筋線維芽細胞分化制御について検討を行った。PINK1, Parkin のノックダウンによりミトファジーを抑制すると、筋線維芽細胞分化が誘導された。また、抗酸化剤である NAC と MitoTEMPO は、ミトファジー抑制による筋線維芽細胞分化誘導を抑制したことから、ミトファジー低下によるミトコンドリア ROS が筋線維芽細胞分化に重要であることが明らかとなった。

我々は、ミトファジー低下による、ROS を介した筋線維芽細胞分化の細胞内伝達機構を明らかにするため検討を行った。ROS は種々の受容体型チロシンキナーゼ、さらにはその下流シグナルを活性化させる。PDGF, FGF, VEGF は、線維化に重要な役割を果たしている代表的なサイトカインであるため、いずれかの受容体の活性化が筋線維芽細胞分化に関与している可能性を考えた。まず、我々は、ATG5 ノックダウンによるオートファジー低下で誘導される筋線維芽細胞分化誘導への、PDGF 受容体阻害剤 AG1296, fibroblast growth factor (FGF) 受容体阻害剤 BGJ398, vascular endothelial growth factor (VEGF) 受容体阻害剤 axitinib の影響を検討した。その結果、AG1296 のみが筋線維芽細胞分化誘導を有意に抑制した。AG1296 は、PINK1, Parkin のノッ

クダウンによるミトファジー抑制による筋線維芽細胞分化誘導に対しても、同様の抑制効果を示した。以上より、ミトファジー低下による筋線維芽細胞分化に PDGF 受容体の活性化が重要である可能性が示唆された。実際に、ミトファジーを抑制すると、PDGF 受容体が活性化し、さらに、その下流の PI3K-Akt も活性化した。また、PDGF 受容体阻害だけでなく、PI3K, Akt の阻害によってもミトファジー誘導筋線維芽細胞分化が抑制された。これらの結果から、ミトファジーによる筋線維芽細胞分化は PDGF 受容体 -PI3K-Akt シグナルを介していることが示された。また、この経路は抗酸化剤である NAC と MitoTEMPO により抑制されたことから、ミトコンドリア由来の ROS がその上流にあると考えられた。

### 3. ミトファジー低下による PDGF-PI3K-Akt シグナルの活性化は、positive feedback loop により持続的する。

PI3K, Akt は mTOR を活性化し、mTOR の活性化はオートファジーを抑制することが知られている。そこで、我々は、ミトファジー抑制による PDGF-PI3K-Akt の活性化が、さらに、mTOR を活性化し、オートファジーを抑制、ROS を増加させ、再び、PDGF-PI3K-Akt を活性化する positive feedback loop を形成している可能性を考えた。実際に、ミトファジー抑制は mTOR を活性化し、オートファジーを抑制 (LC3 で評価) した。ミトファジーを抑制し同時に PI3K, Akt, mTOR を抑制すると、PDGF 受容体を含め、抑制部位の上流のシグナルの活性化が抑制されたことから、positive feedback loop の形成が確認された。

## 考察

これまで、我々は、IPF 肺ではオートファジーが低下していること、さらに、オートファジー低下が筋線維芽細胞分化を誘導することを報告した。本研究では、さらに、1. オートファジーの中でも、特にミトファジーが筋線維芽細胞分化に重要な役割を果たしていること、2. その

機序として、マイトファジー低下による ROS の増加が PDGF-PI3K-Akt 経路の活性化を介して筋線維芽細胞分化を誘導していること、3. 同経路は mTOR を活性化し、更なるオートファジーの抑制による ROS 増加を介して、positive feedback loop の機序で持続的に活性化していることを明らかにした。

IPF 肺でのオートファジーの低下は、我々を含めいくつかの報告がなされている。しかしながら、オートファジー低下と IPF の主要な病態である筋線維芽細胞分化との関連性、更に、その機序の詳細については十分には明らかになっていない。ROS は種々の細胞内シグナル伝達に関与する分子で、これまで、TGF- $\beta$  による NOX4 を介した筋線維芽細胞分化、PTEN の不活性化による PI3K-Akt 経路活性化、さらに受容体型チロシンキナーゼ活性化を介した筋線維芽細胞分化に関与していることが報告されている。特にミトコンドリア由来の ROS は、筋線維芽細胞分化誘導に重要な TGF- $\beta$  のシグナル伝達に重要との報告もある。我々は、マイトファジー低下がミトコンドリア由来の ROS を増加させ、ミトコンドリア由来の ROS が筋線維芽細胞分化を誘導することを明らかとした。

更に、マイトファジー低下により増加した ROS が、PDGF 受容体を活性化させ、その下流の PI3K-Akt シグナルを介して筋線維芽細胞分化を誘導していることも明らかにした。PDGF は肺線維化進展に関与する代表的な成長因子の一つであり、in vitro だけでなく、in vivo においても、その重要性は報告されている。AG1296 やイマチニブなどの PDGF 受容体チロシンキナーゼの阻害剤は動物モデルでの肺線維化を抑制する。さらに、最近では、より強力な PDGF チロシンキナーゼ活性の阻害作用を持つ、BIBF1120 (Nintedanib; PDGF, FGF, VEGF 阻害剤) による、IPF での経年的な呼吸機能低下の有意な抑制が報告された。つまり実際の IPF の病態においても PDGF が重要な役割を果たしていることが示唆される。今回我々が明らかにした、マイトファジー低下とミトコンドリア ROS による PDGF 受容体を介した筋

線維芽細胞分化誘導は、BIBF1120 の IPF での臨床的有効性の観点からも興味深い現象と考えている。

今後は、IPF 肺における PINK1, Parkin の発現を免疫組織染色にて検討し、実際の IPF 肺でのマイトファジーの状態を評価する。更に、Parkin ノックアウトマウスを用いて、動物モデルでの肺線維症における、Parkin で制御されるマイトファジーの役割についても詳細に検討を行う予定である。

## 結論

PINK1-Parkin 系によるマイトファジーの低下は、ミトコンドリア由来 ROS の増加と PDGF 受容体-PI3K-Akt 経路の活性化を介して筋線維芽細胞分化を誘導した。またこの経路は positive feedback loop により、持続的に活性化していた。不十分なマイトファジーによる筋線維芽細胞分化誘導が、IPF の病態に関与している可能性が考えられた。

## 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) Chilos M, et al: Abnormal re-epithelialization and lung remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis: the role of deltaN-p63. Lab Invest.;82:1335-45, 2002

- 7) Nicholson AG, et al: The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 166:173-7 2002
- 8) Fernandez IE, Eickelberg O: New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet.* 380:680-8 2012
- 9) Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF- $\beta$  on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc.* 9:111-6 2012
- 10) He C et al: Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 43:67-93, 2009.
- 11) Del Principe D et al: Fibroblast autophagy in fibrotic disorders. *J Pathol.* 229:208-20 2013
- 12) Kim SI et al: Autophagy Promotes Intracellular Degradation of Type I Collagen Induced by Transforming Growth Factor (TGF) - $\beta$ 1. *J Biol Chem.* 15:11677-88. 2012.
- 13) Pan H et al: Autophagic control of cell 'stemness'. *EMBO Mol Med.* 5:327-31 2013
- 14) Araya J, et al: Insufficient autophagy in Idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1:L56-69, 2013.
- 15) Liu RM et al: Oxidative stress and glutathione in TGF- $\beta$ -mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* 48:1-15. 2010
- 16) Sampson N et al: Therapeutic targeting of redox signaling in myofibroblast differentiation and age-related fibrotic disease. *Oxid Med Cell Longev* 2012:458276. 2012
- 17) Richeldi L et al: Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 365:1079-87 2011
- 18) Ray PD et al: Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 24:981-90 2012
- 19) Zhang J : Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control. *Redox Biol.* 1:19-23. 2013
- 20) 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.
- 21) Bocchino M et al: Reactive oxygen species are required for maintenance and differentiation of primary lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 5 :e14003. 2010

健康危険情報

なし

研究発表

Ito S, et al. *Autophagy* 2014-2015 in press.

Araya J, Kojima J, et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013 ;304 (1) :L56-69.

Araya J, et al. *Intern Med.* 2013;52 (20) :2295-303.

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

# 肺線維症における fibrocyte の遊走と血小板由来増殖因子 (PDGF) の役割

西岡 安彦、佐藤 正大、後東 久嗣

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

## 要旨

Fibrocyte は主に CXCL12/CXCR4 経路を介して肺へ遊走し、線維化を促進する役割を担っていると考えられている。一方、分子標的治療薬イマチニブ (グリベック®) は、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) 受容体の阻害活性を介してマウスブレオマイシン肺線維症モデルにおいて強力な抗線維化作用を有する。今回我々は、イマチニブの抗線維化作用に PDGF 受容体阻害作用を介した fibrocyte の遊走抑制効果が直接的に関与している可能性について検討した。マウスおよびヒト fibrocyte は、PDGF 受容体  $\alpha$  および  $\beta$  を発現していた。イマチニブは *in vitro* において PDGF 刺激による fibrocyte の遊走を阻害し、BLM 肺線維症モデルマウスにおいて肺への fibrocyte の集積を減少させた。さらに、PDGF 受容体特異的な阻害抗体により、fibrocyte の遊走が阻害された。以上のことから fibrocyte は PDGF/PDGF 受容体経路により肺へ遊走し、線維化病態に関与している可能性が示唆された。

## はじめに

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は、原因不明の慢性進行性肺線維化疾患であり未だ生命予後を延長する治療法は確立されておらず、新規治療法の開発が急務となっている。我々は、イマチニブ (グリベック®) が肺線維症の病態において重要な役割を果たしている血小板由来増殖因子 platelet-derived growth factor: PDGF) の受容体の特異的に阻害する点に注目し、ブレオマイシン (bleomycin: BLM) 誘発肺線維症モデルにおける抗線維化効果について検討してきた<sup>1,2)</sup>。その結果、イマチニブは肺線維化早期の短期間 (day0-14) の投与においても強力な抗線維化効果を示すことが明らかとなった。

一方、肺線維症における線維芽細胞の由来として骨髄由来の fibrocyte が注目されている<sup>3)</sup>。Fibrocyte は肺線維化病態において、骨髄から肺へ遊走し線維化促進に作用していると考えられている。そこで本研究では、fibrocyte の肺への遊走

に PDGF/PDGF 受容体経路が直接的に関与している可能性について検討した<sup>4)</sup>。

## 方法

肺線維症モデルは 8 週齢の C57/BL6 マウスに BLM 125mg/kg を Alzet mini-osmotic pump を用いて約 7 日間かけて持続皮下投与することにより作成した。イマチニブ (Novartis 社より供与) は 50mg/kg/day を腹腔内投与した。一方、ヒト fibrocyte は末梢血単核球を fibronectin コートフラスコで培養し誘導した。マウス fibrocyte の回収には BLM 投与後の肺組織を使用した。線維化肺を細切後、collagenase で処理し細胞浮遊液を作製した。フィブロネクチンコート培養皿で 1 週間培養し、付着細胞から CD45 ビーズを用いて fibrocyte を単離した。Fibrocyte の PDGF 受容体発現は FACS および RT-PCR 法にて検討した。Fibrocyte の PDGF による遊走能は、ボイデンチャンバー法にて解析した。BLM 肺線維症マウスモデル

の肺組織中 fibrocyte 数の検討は、肺をトリプシン処理後、付着細胞に対して抗 CD45 抗体、抗 CXCR4 抗体、抗 collagen I 抗体による 3 重染色法を行い、フローサイトメトリー法にておこなった。また、抗 CD45 抗体と FSP-1/S100A4 抗体を用いた蛍光二重免疫染色法にて検討した。

### 結果

分離されたヒト、マウス fibrocyte は、抗 CD45 抗体、抗 CXCR4 抗体、抗 collagen I 抗体による 3 重染色法が陽性であることを確認し実験に使用した。一方、マウスおよびヒト fibrocyte には、フローサイトメトリー法および RT-PCR 法にて PDGF 受容体  $\alpha$  および  $\beta$  の発現が確認された (図 1)。ヒト fibrocyte を用いて、PDGF に対する遊走能を検討した結果、CXCL12 のみならず PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC は fibrocyte に対して遊走活性を示した (図 2)。中でも、PDGF-BB は、CXCL12 よりも高い遊走活性を示した。イマチニブは、PDGF によって誘導される fibrocyte の遊走を阻害した (図 2)。さらに、マウス PDGF 受容体  $\alpha$  および  $\beta$  特異的阻害抗体の処理により、fibrocyte の PDGF による遊走活性が阻害された。一方、BLM 肺線維症モデルを用いたフローサイトメトリー法による解析から、BLM 投与後 10 日目に肺内の fibrocyte 数がピー

クに達し、その後減少することが明らかとなった (図 3)。イマチニブの投与は、肺の fibrocyte 数を減少させた。さらに、PDGF 受容体  $\alpha$  および  $\beta$  に対する阻害抗体の投与により、有意に fibrocyte 数が減少したが、抗 PDGF 受容体  $\beta$  抗体 (APB5) は抗 PDGF 受容体  $\alpha$  抗体 (APA5) より強力な阻害効果を示した。イマチニブによる fibrocyte の遊走阻害作用は、BLM 肺線維症モデルにおける線維化肺組織を用いた蛍光免疫染色法によっても確認された<sup>4)</sup>。

一方、健常人と IPF 患者におけるヒト末梢血 fibrocyte の比較検討では、健常人に比較して IPF 患者で抗 PDGF 受容体  $\beta$  の発現が有意に高かった (図 5)

### 考察

今回我々は、fibrocyte の新たな遊走機序として PDGF/PDGF 受容体経路の役割を検討した。その結果、in vitro の実験において fibrocyte は PDGF 刺激により高い遊走活性を示した。特に PDGF-BB はこれまでの検討から fibrocyte の遊走に主要な役割を果たしていると考えられてきた CXCL12 より高い遊走活性を示した。この結果は、実際に肺線維症において fibrocyte の肺への遊走に PDGF が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。実際に、マウス BLM 肺線維症モデルにおいて、

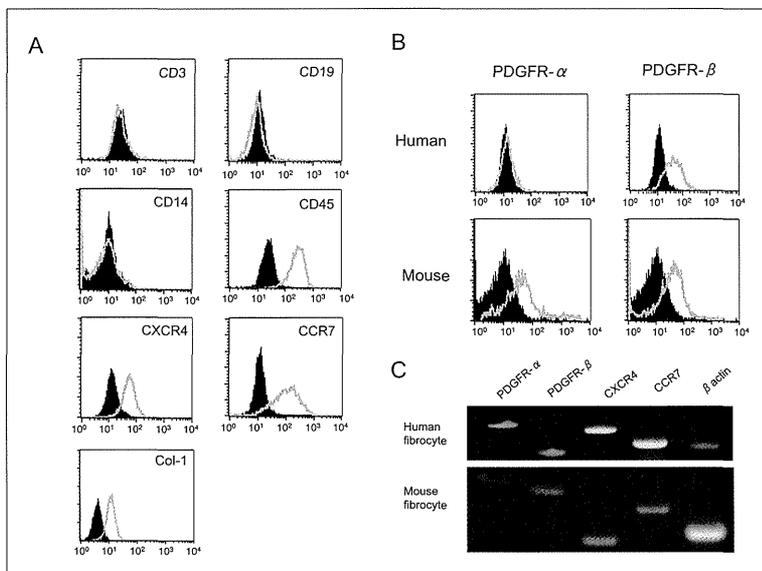


図 1 マウスおよびヒト fibrocyte における PDGF 受容体の発現

A ; ヒト fibrocyte の細胞表面抗原発現  
フローサイトメトリー法による検討では、fibrocyte マーカーである CD45、CXCR4、collagen I の発現を認めた。  
B ; マウス、ヒト fibrocyte の PDGF 受容体発現  
Fibrocyte における PDGF 受容体発現を FACS にて解析した結果、マウスでは PDGF  $\alpha$  と  $\beta$ 、ヒトでは PDGF  $\beta$  の強い発現を認めた。  
C ; Fibrocyte における PDGF 受容体の mRNA 発現  
マウスおよびヒト fibrocyte から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて PDGF 受容体発現を検討した。文献 4 より引用。

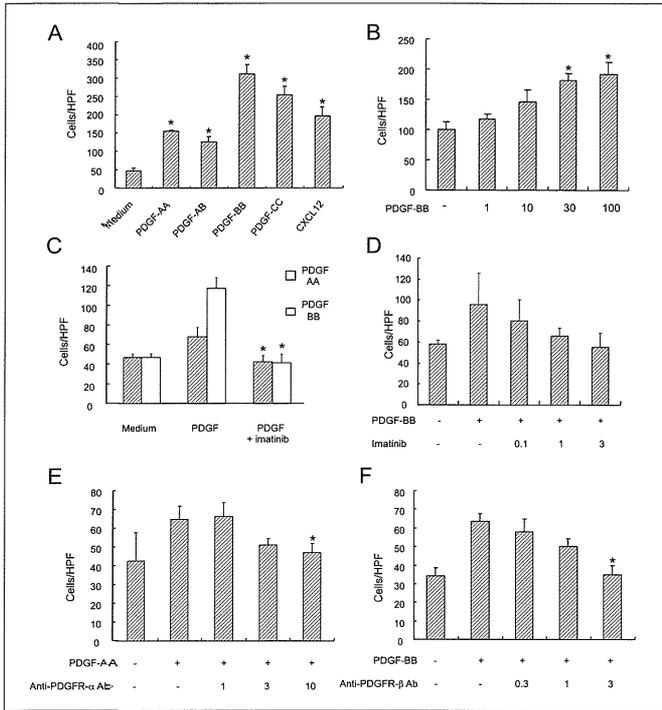


図2 ヒト fibrocyte の PDGF 刺激による遊走能の検討

Fibrocyte の遊走能はポイデンチャンバー法にて解析した。  
**A** ; 各種刺激による fibrocyte の遊走能  
 PDGF-AA, -AB, -BB, -CC, CXCL12 それぞれ 100ng/ml を用いて検討した。  
**B** ; fibrocyte の遊走に及ぼす PDGF-BB の用量依存性効果  
**C** ; PDGF による fibrocyte の遊走に及ぼすイマチニブの効果  
 PDGF-AA および PDGF-BB それぞれ 20ng/ml を用いて、イマチニブ (1 $\mu$ M) の阻害効果を検討した。  
**D** ; PDGF-BB による fibrocyte の遊走活性に及ぼすイマチニブの用量依存性結果  
 PDGF-BB 20ng/ml を使用した。  
**E, F** ; PDGF-AA および PDGF-BB による fibrocyte の遊走活性に及ぼす抗 PDGF 受容体阻害抗体の効果  
 PDGF 20ng/ml で刺激し、抗 PDGF 受容体  $\alpha$  抗体 (APA5)、抗 PDGF 受容体  $\beta$  (APB5) を用いて検討した。  
 文献 4 より引用 . \* $p < 0.05$

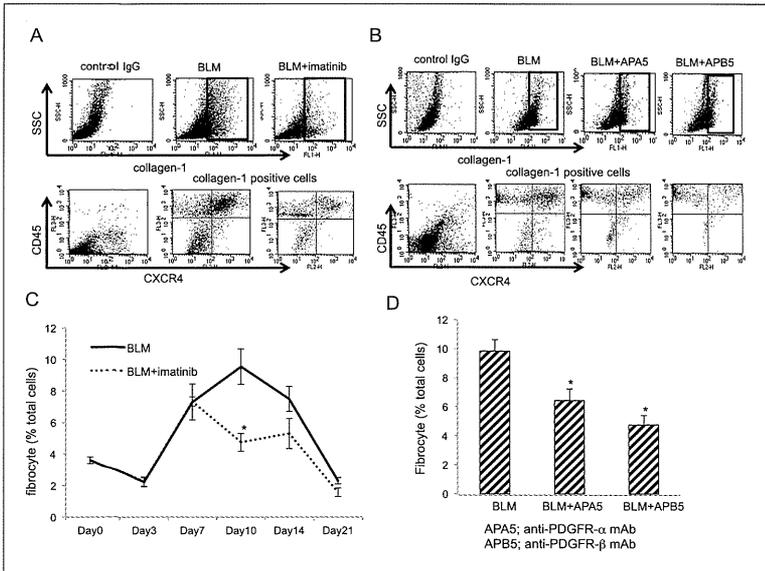


図3 BLM 肺線維症モデルにおける肺 fibrocyte の検討

BLM モデルマウスにイマチニブ 50mg/kg/day を連日腹腔内投与し、経時的に肺 fibrocyte 数についてフローサイトメトリー法にて検討した。  
**A** ; BLM 投与後 10 日目の肺内 fibrocyte の同定  
**B** ; 抗 PDGF 受容体抗体 APA5 および APB5 の肺内 fibrocyte 数の検討  
**C** ; BLM 肺線維症モデルにおける経時的な fibrocyte 数の推移とイマチニブの効果  
 イマチニブ投与により 10 日目を中心に fibrocyte 数の減少を認めた。  
**D** ; 抗 PDGF 受容体  $\alpha$  抗体 APA5 および抗 PDGF 受容体  $\beta$  抗体 APB5 による肺内 fibrocyte 数の抑制効果  
 文献 4 より引用 . \* $p < 0.05$

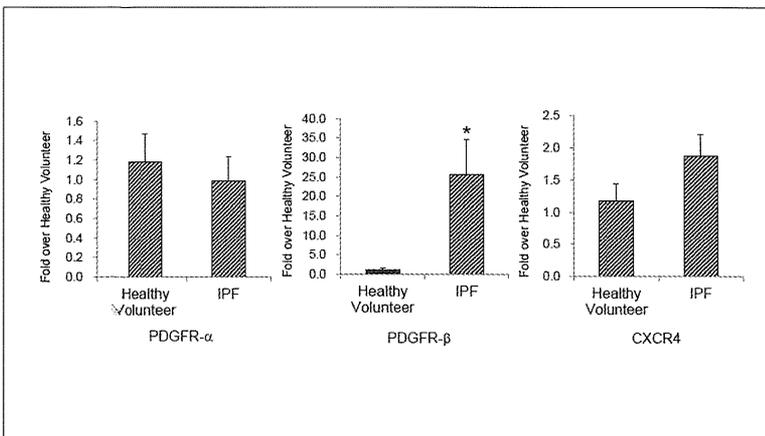


図4 IPF 患者末梢血由来 fibrocyte の PDGF 受容体発現の検討

健康人 5 名および IPF 患者 4 名の末梢血から fibrocyte を誘導し、RT-PCR 法にて PDGF 受容体  $\alpha$ 、 $\beta$ 、CXCR4 の発現を検討した。文献 4 より引用 . \* $p < 0.05$

気管支肺胞洗浄液中の PDGF-AB および PDGF-BB は、BLM 投与後早期から上昇していることを確認している。さらに、PDGF による fibrocyte の遊走は、イマチニブや抗 PDGF 受容体特異抗体によって阻害された。BLM 肺線維症モデル肺においても、イマチニブ及び抗 PDGF 受容体抗体の投与は、肺への fibrocyte の遊走を阻害した。

以上の結果から、PDGF/PDGF 受容体経路の阻害は、fibrocyte の遊走阻害によって抗線維化効果を発揮するアプローチであると考えられる。イマチニブや抗 PDGF 受容体抗体の投与によって BLM 肺線維症モデルにおける肺の fibrocyte 数が減少したことから、これらの薬剤は肺線維症治療薬としての可能性が示唆される。一方、最近、PDGF 受容体、線維芽細胞増殖因子 (FGF) 受容体および血管内皮増殖因子 (VEGF) 受容体のマルチキナーゼ阻害薬であるニンテダニブの IPF に対する第 III 相臨床試験である INPULSIS 試験結果が発表された<sup>5)</sup>。その結果、ニンテダニブは有意に努力性肺活量の低下を抑制するという進行抑制効果を示した。現在のところニンテダニブの詳細な抗線維化メカニズムは不明であるが、PDGF 受容体阻害効果はその主作用である可能性がある。

一方、IPF 患者末梢血単核球由来の fibrocyte を用いて、PDGF 受容体発現について検討したところ、IPF 患者では健常人に比較して PDGF 受容体  $\beta$  の発現が亢進していたことから、fibrocyte への作用として PDGF 受容体  $\beta$  を介したシグナルが重要である可能性が示唆された。

今後、詳細なニンテダニブの作用機序を解明するとともに、PDGF シグナルについての検討を進めることにより、増殖因子を標的とした新たな IPF 治療の開発へと繋がることが期待される。

## 参考文献

- 1) Aono Y, Nishioka Y, Inayama M, Kishi J, Ugai M, Uehara H, Izumi K, Sone S. Imatinib is a novel anti-fibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1179-1185, 2005.
- 2) Azuma M, Nishioka Y, Aono Y, Inayama M, Makino H, Kishi J, Shono M, Kinoshita K, Uehara H, Ogushi F, Izumi K, Sone S. Role of  $\alpha$  1-acid glycoprotein in therapeutic antifibrotic effects of imatinib plus macrolides in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 176: (12) 1243-1250, 2007.
- 3) Naozumi Hashimoto, Hong Jin, Tianju Liu, Stephen W. Chensue, and Sem H. Phan. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*.113: 243-252, 2004.
- 4) Aono Y, Kishi M, Yokota Y, Azuma M, Kinoshita K, Takezaki A, Sato S, Kawano H, Kishi J, Goto H, Uehara H, Izumi K, Nishioka Y. Role of PDGF/PDGFR axis in the trafficking of circulating fibrocytes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 51:793-801, 2014.
- 5) Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, Cottin V, Flaherty KR, Hansell DM, Inoue Y, Kim DS, Kolb M, Nicholson AG, Noble PW, Selman M, Taniguchi H, Brun M, Le Maulf F, Girard M, Stowasser S, Schlenker-Herceg R, Disse B, Collard HR; INPULSIS Trial Investigators. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 370:2071-2082, 2014.

# 各個研究

---

## I. 間質性肺炎

### 治療（臨床）に関する研究

10. 膠原病的背景を有する特発性間質性肺炎の  
多施設共同コホート研究～中間解析 2014～
11. 当院における間質性肺炎急性増悪に対する PMX-DHP 施行  
例の臨床的検討
12. 血清 KL-6 値を反映した薬剤性肺炎の治療指針案の  
後ろ向き検討
13. 長期酸素療法導入後の特発性肺線維症患者の予後調査と  
予後予測因子の前向き検討（本年度進捗）
14. 特発性肺線維症患者に対する Pirfenidone 治療効果予測の検討
15. 特発性肺線維症合併肺癌に対する周術期 pirfenidone 療法  
の経験
16. 間質性肺炎に対するミゾリピンの使用経験
17. CPFE 合併肺癌患者の治療別予後解析とリスク因子

# 膠原病的背景を有する特発性間質性肺炎の 多施設共同コホート研究～中間解析 2014～

須田 隆文、榎本 紀之

浜松医科大学内科学第 2 講座

**【背景】** 近年、確立した膠原病の診断基準を満たさないが膠原病との関連が疑われる間質性肺炎症例が注目されている。これらの患者群は、報告者によって undifferentiated connective tissue disease (UCTD) の肺病変, lung-dominant connective tissue disease (LD-CTD), autoimmune-featured interstitial lung disease (AIF-ILD) などと呼ばれ、それぞれ異なる診断基準が提唱されている。また、これらの膠原病的背景を有する間質性肺炎をまとめて、interstitial pneumonia with autoimmune features (IPAF) と呼ぶ事が提唱されている。しかし、特発性間質性肺炎 (IIPs) においてこの患者群の頻度や予後は十分解明されていない。

**【目的】** IIPs において、UCTD, LD-CTD, AIF-ILD などの頻度や臨床像、予後の違いを明らかにする。

**【対象と方法】** 2013 年 4 月から新規に IIPs と診断された連続症例を登録し、多施設共同、前向き の追跡調査を行う。診断時の関節症状や自己抗体などの膠原病的所見を網羅的に確認し、1 年毎に経過を登録する。今回は 2014 年 12 月までの登録症例を対象として中間解析を行った。

**【結果】** 全国 40 カ所の研究協力施設から IIPs 156 症例 (男性 107 例、女性 49 例、平均年齢 68.6 才) が登録された。IIPs 組織型の内訳は、IPF 63 例 (40%: 組織診断 14 例、臨床診断 49 例)、NSIP 12 例 (8%)、COP 7 例 (5%)、unclassifiable (VATS あり) 10 例 (6%)、unclassifiable (VATS なし) 64 例 (41%) であった。156 例のうち、UCTD (Broader definition) は 40 例 (25.6%)、UCTD (Stricter definition) は 19 例 (12.2%)、LD-CTD は 54 例 (34.6%)、AIF-ILD は 26 例 (16.7%) においてそれぞれの診断基準を満たした。UCTD (Broader definition) 以外の診断基準では IPF よりも NSIP に多く陽性例を認めた。50 症例について 1 年後の経過観察を行い 3 例 (6%) に膠原病の発症を認め、うち 2 例は IPAF 陽性であった。また、3 例 (6%) の死亡を確認した。IPAF 陰性の 2 例は IP 急性増悪により、IPAF 陽性の 1 例は IP の慢性悪化により死亡した。

**【結論】** 新規 IIPs 症例の 12.2～34.6% において膠原病的要素が認められた。今後、300 例を目標に症例登録を継続し予後との関連も検討する予定である。

## A. 研究の背景と目的

特発性間質性肺炎 (IIPs) は原因不明の間質性肺炎であり、この中で特発性肺線維症 (IPF) が多くを占め、かつ最も予後不良であることが知られている。膠原病もまた間質性肺炎の原因となり得るが、その予後は IPF と比較し良好との報

---

浜松医科大学内科学第 2 講座

住所 〒 431-3129 静岡県浜松市東区半田町 1-20-1

電話 053-435-2263 FAX 053-435-2449

E-mail norieno@hama-med.ac.jp

告が多い<sup>1</sup>。近年、IIPs と診断された症例において、膠原病の確立した診断基準は満たさないが、膠原病と関連した症状や検査所見を示す間質性肺炎の患者群が注目されてきている。これらの患者群は報告者によって、undifferentiated connective tissue disease (UCTD) の肺病変<sup>2,3</sup>、lung-dominant connective tissue disease (LD-CTD)<sup>4</sup>、autoimmune-featured interstitial lung disease (AIF-ILD)<sup>5</sup>などと呼ばれ、それぞれの異なる診断基準が提唱されている。また、これらの膠原病的背景を有する間質性肺炎をまとめて、interstitial pneumonia with autoimmune features (IPAF) と呼ぶことが提唱されている。

我々は UCTD を満たす Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) は、満たさない症例と比較し予後良好であることを報告した<sup>6</sup>。その他の予後に関する報告では、IPAF のいずれかの診断基準を満たす症例は予後が良好であるという報告<sup>2,7</sup>や、対照的に IPAF 診断は予後と関連しないとの報告も認められ<sup>3,5,8</sup>結果は一致していない。以上のように、IIPs の中で膠原病との関連が疑われる患者群の治療反応性、予後などが報告により異なるため、より詳細な検討が望まれている。また、今までの報告の大部分は後向き研究であり、症例選択バイアスや各診断基準における項目の欠損などによって診断にバイアスがかかっている可能性がある。そこで今回我々は、全 IIPs 症例を対象として、診断時に膠原病と関連した所見を網羅的にチェックした上で経過を観察する前向き調査を計画した。本研究によって、IIPs における

UCTD, LD-CTD, AIF-ILD などの頻度や、このような症例の臨床像、予後などを明らかにすることができると考えられる。

## B. 研究方法

新規に IIPs と診断された連続症例を登録し、多施設共同、前向きな追跡調査を行う。現在までに全国 40 施設から研究協力の了解を得られ、各施設の倫理委員会において承認された施設において 2013 年 4 月からの登録を開始した。紙面にて同意を得られた症例を登録した。診断時に膠原病を疑う症状、理学的所見、自己抗体を含む血液検査の結果などを網羅的に確認し、外科的肺生検例では組織所見などを記入する。また、1 年毎にその経過を確認する。いずれかの膠原病の診断基準を満たした症例、過敏性肺炎や塵肺など明らかな原因を有する症例は除外した。

## C. 結果

### 1) 臨床像および一般検査成績

2013 年 4 月から 2014 年 12 月までに 156 症例が登録された。IIPs 診断時の臨床像を Table 1 に示す。男性 107 名、女性 49 名、診断時の平均年齢は  $68.6 \pm 9.8$  才であった。受診動機は症状受診が 101 例と最多であり、124 例が慢性の経過であった。診断時の検査成績を Table 2 に示す。平均の血清 KL-6 1095 U/mL、SP-D 226 ng/mL と高値であった。Forced vital capacity (FVC) は平均 2.46L (80.4%)、肺拡散能 (DLCO) は平均 66.7% と比較的保たれていた。また、安静時の酸

Table 1. 診断時の臨床像

	n = 156 (mean ± SD)
性別, 男性 / 女性	107 / 49
診断時の年齢, 才	68.6 ± 9.8
喫煙歴, current / ex / never	19 / 85 / 52
受診動機, 症状受診 / 検診発見 / その他	101 / 40 / 15
発症形式 急性 / 亜急性 / 慢性 / 不明	4 / 19 / 124 / 8
外科的肺生検, n (%)	39 (25.0)

Table 2. 診断時の検査成績

	n = 156 (mean ± SD)
生化学検査	
LDH, U/L	227 ± 61
KL-6, U/ml	1095 ± 853
SP-D, ng/ml	226 ± 143
呼吸生理検査	
FVC, L	2.46 ± 0.89
FVC, % predicted	80.4 ± 20.8
DLCO, % predicted	66.7 ± 21.7
安静時 PaO <sub>2</sub> , mm Hg	79.6 ± 13.3
6 分間歩行距離, m	387 ± 113
最低 SpO <sub>2</sub> , %	88.5 ± 9.2

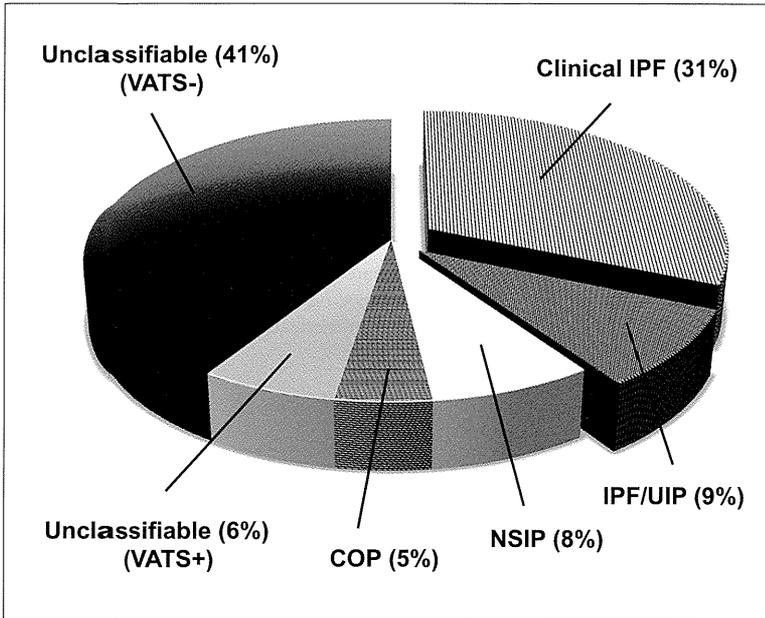


Figure 1. 登録症例における組織型の内訳.

全156例中、特発性肺線維症 (IPF) は63例 (40%: 組織診断14例 (9%)、臨床診断49例 (31%))、nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) 12例 (8%)、cryptogenic organizing pneumonia (COP) 7例 (5%)、外科的肺生検を実施した unclassifiable 10例 (6%)、外科的肺生検を実施していない unclassifiable (組織型不明) 64例 (41%) であった。組織型の判明している症例に限定すると IPF が68% を占めていた。

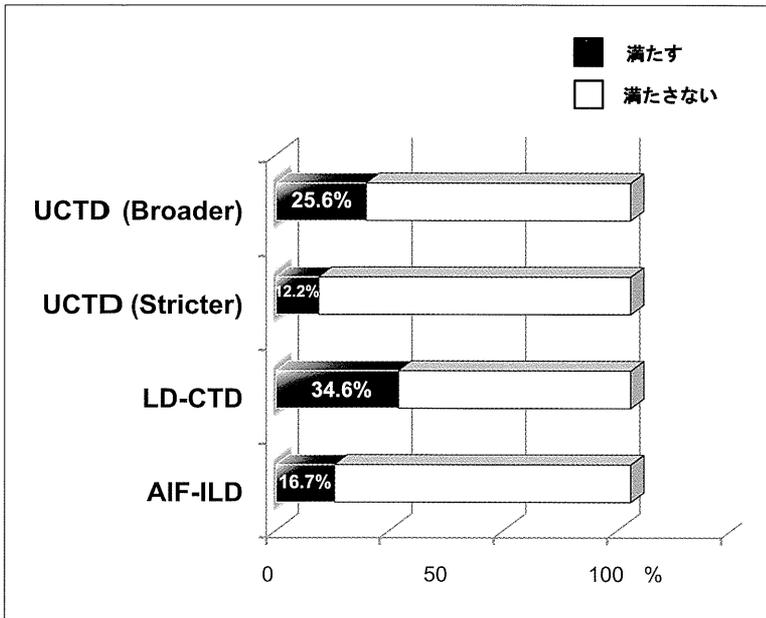


Figure 2. 全登録症例における undifferentiated connective tissue disease (UCTD) の肺病変、lung-dominant connective tissue disease (LD-CTD) および autoimmune-featured interstitial lung disease (AIF-ILD) の頻度.

全登録156症例において各診断基準を満たした症例の頻度は、UCTD (Broader definition) 40例 (25.6%)、UCTD (Stricter definition) 19例 (12.2%)、LD-CTD 54例 (34.6%)、AIF-ILD 26例 (16.7%) であった。

素化は室内気で平均 PaO<sub>2</sub> 79.6 mmHg と保存されていたが<sup>3)</sup>、6分間歩行テストでは平均距離 387m、平均の最低 SpO<sub>2</sub> 88.5% と低値であり運動耐容能が低下していた。

## 2) 登録症例の組織型

外科的肺生検は39例 (25%) に実施された。登録症例における組織型の内訳を Figure 1 に示す。特発性肺線維症 (IPF) 63例 (40%: 組織診断14例 (9%)、臨床診断49例 (31%))、nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) 12例

(8%)、cryptogenic organizing pneumonia (COP) 7例 (5%)、外科的肺生検を実施した unclassifiable 10例 (6%)、外科的肺生検を実施していない unclassifiable (組織型不明) 64例 (41%) であった。組織型の判明している症例に限定すると IPF が68% を占めていた。組織型不明の64例は high-resolution computed tomography (HRCT) において usual interstitial pneumonia (UIP) パターンを示さず、かつ外科的肺生検を施行していない症例であった。

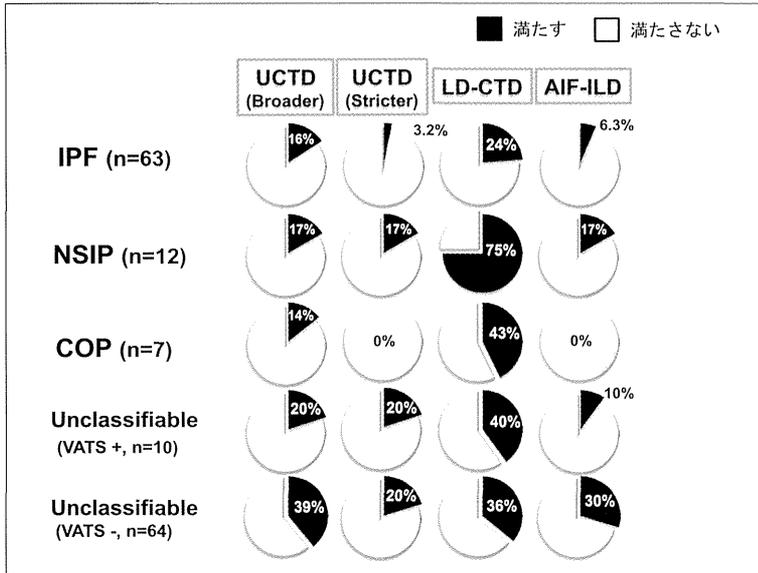


Figure 3. 各組織型における undifferentiated connective tissue disease (UCTD) の肺病変、lung-dominant connective tissue disease (LD-CTD) および autoimmune-featured interstitial lung disease (AIF-ILD) の頻度。

UCTD (Broader definition) では IPF と NSIP の頻度はほぼ同等であった。UCTD (Stricter definition) において NSIP は IPF よりも 5 倍程度と高頻度であった。UCTD (Stricter definition) での各組織型における陽性頻度は AIF-ILD のものと類似していた。AIF-ILD および LD-CTD でも NSIP が IPF よりも約 3 倍と高頻度であった。

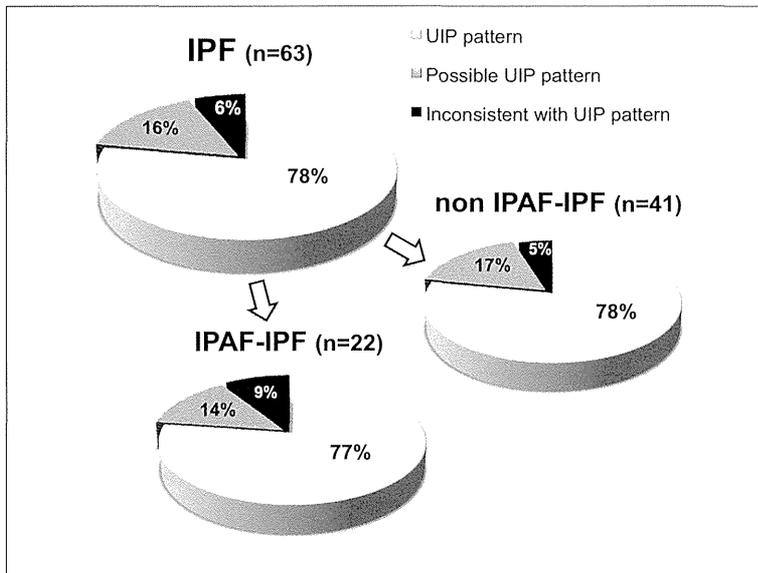


Figure 4. IPF 症例における HRCT パターンの比較。

IPF 63 例における診断時の HRCT パターンを比較検討した。いずれかの診断基準を満たした IPAF 症例と non IPAF 症例を比較したが、HRCT パターンに明らかな相違は認められなかった。

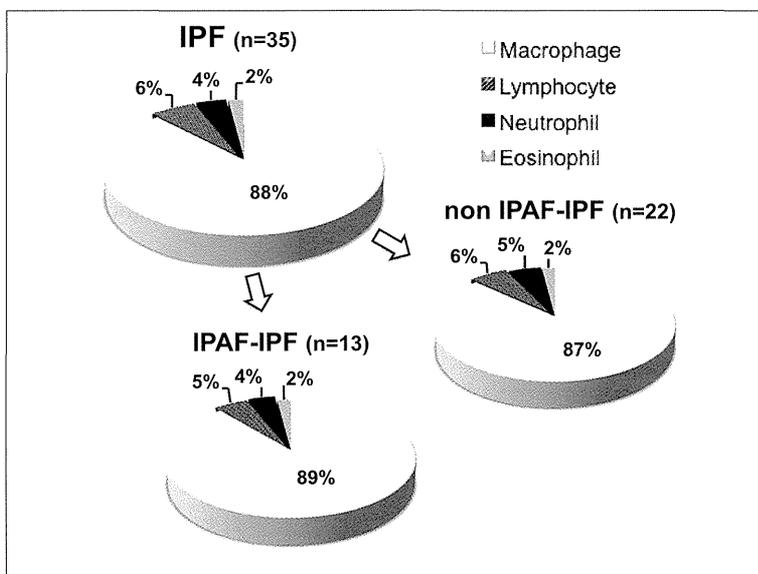


Figure 5. IPF 症例における気管支肺胞洗浄での細胞分画の比較。

気管支肺胞洗浄 (BAL) を実施した IPF 35 例での細胞分画を比較検討した。いずれかの診断基準を満たした IPAF 症例と non IPAF 症例を比較したが、BAL での細胞分画に明らかな相違は認められなかった。

Table 3. 膠原病関連の症状

	n = 156 (%)
皮膚・粘膜病変	21 (13.5)
手指の硬化	6 (4.8)
レイノー症状	5 (4.0)
光線過敏	3 (2.4)
口腔潰瘍	2 (1.6)
爪上皮延長	2 (1.6)
朝のこわばり	6 (5.1)
多関節痛・腫脹	4 (3.4)
原因不明の体重減少	10 (8.2)
胃・食道逆流	9 (7.9)
漿膜炎	4 (3.4)
近位筋の筋力低下・筋痛	2 (1.6)
乾燥症状	14 (11.1)
シルマー試験	5 (17.9)
ガム試験	4 (20.0)

Table 4. 血液検査所見の陽性頻度

	n = 156 (%)
抗核抗体	83 (53.2)
リウマチ因子	35 (23.2)
高γグロブリン血症	32 (21.1)
抗SS-A抗体	9 (5.8)
低補体血症	7 (5.6)
抗セントロメア抗体	7 (4.6)
抗dsDNA抗体	5 (3.3)
抗CCP抗体	5 (3.2)
抗ARS抗体 (抗Jo-1抗体を除く)	4 (2.7)
抗Scl-70抗体	4 (2.6)
MPO-ANCA	4 (2.6)
PR3-ANCA	4 (2.6)
抗DNA抗体	3 (2.0)
抗Jo-1抗体	2 (1.3)
抗RNP抗体	2 (1.3)
抗RNAポリメラーゼIII抗体	5
抗CLβ2GPI抗体	2

Table 5. 1年後の臨床経過

	n = 50	
間質性肺炎に対する治療, +/-	25 / 25	
膠原病の発症, +/-	3 / 47	
転帰, 死亡 / 生存	3 / 47	
膠原病発症 3例の内訳	臨床診断	IPAF診断
RA	Unclassifiable	LD-CTD+, UCTD(Br,St)+, AIF+
DM + SjS	Unclassifiable	-
mPA	IPF	UCTD(Br)+
3例の死亡原因	臨床診断	IPAF診断
急性増悪	IPF	-
急性増悪	Unclassifiable	-
IP慢性進行	Unclassifiable	UCTD(Br)+, AIF+

### 3) 膠原病的背景の検討

全登録症例において各診断基準を満たした症例の頻度は、UCTD (Broader definition)<sup>2</sup> 40例 (25.6%)、UCTD (Stricter definition)<sup>3</sup> 19例 (12.2%)、LD-CTD<sup>4</sup> 54例 (34.6%)、AIF-ILD<sup>5</sup> 26例 (16.7%)であった (Figure 2)。この中で、症状や所見が診断に必要なLD-CTDでの頻度が最も高値であった。各組織型におけるIPAF症例のそれぞれの頻度をFigure 3に示す。既報と比較し、各診断基準を満たす症例の頻度は総じて低値であった。UCTD (Broader definition)ではIPFとNSIPの頻度はほぼ同等であった。UCTD (Stricter definition)においてNSIPはIPFよりも5倍程度と高頻度であった。また、外科的肺生検を実施した unclassifiable 症例において20%と高頻度であった。UCTD (Stricter definition)での各組織型における陽性頻度はAIF-ILDのものと非常に類似していた。AIF-ILDおよびLD-CTDでもNSIPがIPFよりも3倍ほど高頻度であった。

陽性と認められた膠原病関連の症状をTable 3に示す。粘膜・皮膚病変が最多であり13.5%を占めていた。その中でも手指硬化6例 (4.8%)、レイノー症状5例 (4.0%)と高頻度であった。その他にも乾燥症状14例 (11.1%)、原因不明の体重減少10例 (8.2%)、食道・胃逆流症状9例 (7.9%)、朝のこわばり6例 (5.1%)、多関節痛・腫脹4例 (3.4%)などが高頻度の症状・所見であった。血清自己抗体等の検査成績をTable 4に示す。陽性頻度は抗核抗体 (≥40倍) 83例 (53.2%)、リウマチ因子35例 (23.2%)、高γグロブリン血症32例 (21.1%)、抗SS-A抗体9例 (5.8%)の順に多く認めた。

IPF 63例における診断時のHRCTパターンをFigure 4に示す。いずれかの診断基準を満たしたIPAF症例とnon IPAF症例を比較したが、HRCTパターンに明らかな相違は認められなかった。同様に気管支肺胞洗浄 (BAL) を実施したIPF 35例での細胞分画をFigure 5に示す。IPAF症例とnon IPAF症例では、BALでの細胞分画に明らかな相違は認められなかった。