

平成 21 年 6 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790564
 研究課題名（和文）
 肺線維化における thrombospondin-1 を新規標的分子とした治療戦略
 研究課題名（英文）
 New therapeutic strategy targeting thrombospondin-1 in pulmonary fibrosis

研究代表者
 石井 寛（ISHII HIROSHI）
 大分大学・医学部・助教
 研究番号：60398146

研究成果の概要：

間質性肺炎群と健常人の血清および気管支肺胞洗浄液を用いてTSP-1濃度をELISA法にて測定した。血清TSP-1濃度は間質性肺炎群で高値を呈し、VEGF濃度と相関しており、本疾患の病態におけるTSP-1の重要性が示された。免疫組織化学的検討では再生肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージの重要性が示唆された。TSP-1に対するsiRNA（short interfering RNA）を数種類作製し、気道上皮細胞を用いた実験において、一つのsiRNAで良好な抑制効果がみられるようになった。肺線維症動物モデルにおける気道へのsiRNA-TSP-1投与方法を思案しながら、抑制実験にとりかかっている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,500,000円	0円	1,500,000円
20年度	1,300,000円	390,000円	1,690,000円
年度			
総計	2,800,000円	390,000円	3,190,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器病学

1. 研究開始当初の背景

肺線維症はその予後の悪さにもかかわらず病態は不明で有効な治療はない。TGF-β1

は組織の修復や線維化を促進する cytokine の代表であるが、TGF-β1 をターゲットとした臓器線維症の治療法も確立していない。TGF-β1 はレセプターへの結合前に細胞外で

活性化されるといった性質を持つため、TGF-β1 そのものの抑制は、線維化抑制以外のさまざまな副反応を生ずるといった難点があった。

そこで、angiogenesis に深く関わりながら latent TGF-β1 を活性化させる作用を持つ糖蛋白 thrombospondin (TSP)-1 に着目した。動物モデルでは TSP-1 レセプターである CD36 の投与によりブレオマイシン肺臓炎の抑制がみられるなど (*Am J Respir Cell Mol Biol* 2000, 23: 204-212) 臓器線維症の治療における新規標的分子の 1 つとして TSP-1 は注目されつつあった。

2 . 研究の目的

肺の線維化における TSP-1 の役割を明らかにし、TSP-1 を介した TGF-β1 の活性化の阻害、つまり TSP-1 を標的とした画期的な肺線維症の治療戦略を見出すことを目的とした。

3 . 研究の方法

(1) 特発性肺線維症 (IPF) をはじめとする特発性間質性肺炎患者の肺組織における TSP-1 の局在を、免疫組織化学的検討により確認し、標的細胞を絞り込む。

対象 (外科的肺生検症例) :

- Usual interstitial pneumonia (UIP/IPF) 5 例
- Fibrotic nonspecific interstitial pneumonia (fNSIP) 5 例
- Normal lung 5 例

免疫染色 (抗体) :

- TSP-1 (Clone A6.1, Lab Vision Corporation,

CA)

- SP-A (VisionBioSystems, NovocastraTM, UK)
- CD68 (DakoCytomation, Denmark)

また、これらの患者血清および気管支肺胞洗浄液中の TSP-1 濃度を測定し、他のバイオマーカーや臨床経過との関連について検討し、さらに他の疾患群とも比較することで、疾患特異性を評価する。

対象 :

- UIP/IPF 23 例
- Idiopathic fNSIP 22 例
- Sarcoidosis 28 例
- Healthy volunteer 15 例

測定項目 :

- TSP-1 (CHEMICON International)
- KL-6 (Sanko Junyaku Co.)
- Surfactant protein-A (SP-A ; Sysmex Corp.)
- Surfactant protein-D (SP-D ; Yamasa Shoyu Co.)
- Vascular endothelial growth factor (VEGF ; Pierce, Rockford, IL)

(2) TSP-1 に対する siRNA (short interfering RNA) を作製し、これにより肺細胞における TSP-1 産生能が抑制されることを *in vitro* で確認する。具体的には、肺胞 II 型上皮細胞の cell line を TGF-β1 によって刺激すると TSP-1 の産生が亢進することが確認されているため、この系を用いた。

Cell line : A549

siRNA : 作製は Ambion 社に依頼

使用試薬 :

- NeoFx (Ambion)
- Opti-MEM (GIBCO)
- Rneasy® Mini Kit (QIAGEN)
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI)

リバーストランスフェクション法により TSP-1 に対する各種 siRNA を A549 細胞に導入し、0.5 ng/ml の TGF- β 1 により刺激した際の TSP-1 の mRNA レベルを real time PCR 法により検討した。

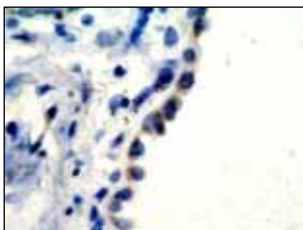
(3) 肺線維症動物モデルを用い、TSP-1 に対する siRNA 投与による肺の線維化抑制効果を明らかにする。

ブレオマイシン尾静脈投与モデル (ICR マウス、10 週、雄、ブレオマイシン 10mg/kg/day を 5 日間連続投与) を用い、治療実験は前投与および後投与の両方おこなう。主に線維化が強く認められるブレオマイシン投与 5~7 週目のマウス肺組織を用いて、線維化の程度 (Ashcroft score による半定量、ハイドロキシプロリン定量) を検討し治療効果判定をおこなう。siRNA 投与方法については、まずは経鼻投与を行なうが、必要に応じていくつかのデリバリーシステムを試す。

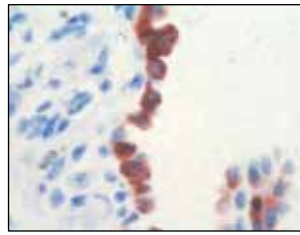
4. 研究成果

(1)

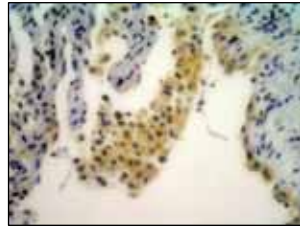
免疫染色：



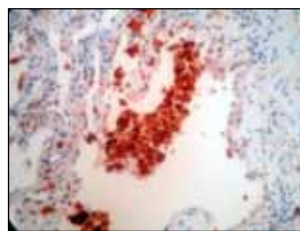
(TSP-1 in fNSIP)



(SP-A in fNSIP)



(TSP-1 in UIP/IPF)



(CD68 in UIP/IPF)

Fibrotic NSIP および UIP/IPF 患者の肺組織において、TSP-1 はそれぞれ病変の活動性が部位において、II 型肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージの細胞質に強発現していた。両疾患で陽性細胞をカウントして比較したが、優位な差は認められなかった。

バイオマーカーとしての TSP-1 :

血清 TSP - 1 濃度は、サルコイドーシスや健常者と比較して、Fibrotic NSIP および UIP/IPF 患者で有意に高値を呈し ($p < 0.0001$), 特に angiogenesis に関与する血清 VEGF 濃度と強く相関しており ($p = 0.0004$), %肺活量とは不の相関関係 ($p < 0.05$) がみられ、疾患活動性との関与が示唆された。

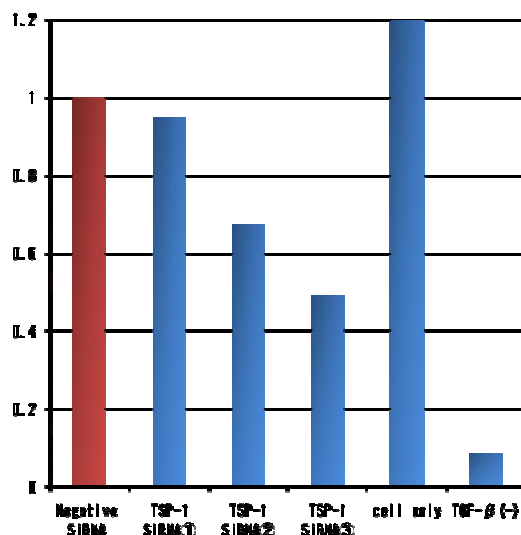
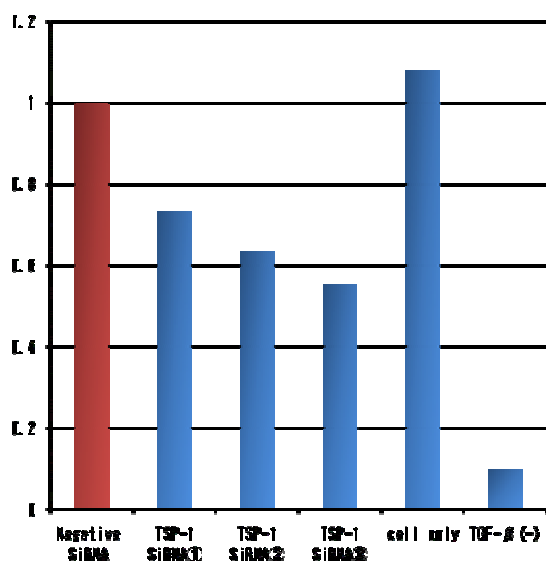
ただし従来いわれている疾患活動性マーカーである血清 KL-6, SP-D, SP-A や、動脈血酸素分圧、肺拡散能との相関はなく、血漿 endothelin-1 との相関もなかった。また気管支

肺胞洗浄液中の TSP-1 濃度は疾患活動性との関与は不明であった。

なお、近年 IPF の急性増悪例に対して、ステロイドパルス療法が無効の場合にエンドトキシン吸着療法が行なわれており、救命例の報告が散見されているが、その機序は解明されていない。当科でも倫理委員会の承認のもと数例施行したが、血清中の TSP-1 濃度は救命例のみで吸着療法前後で低下しており、この療法の機序解明の一助となる可能性が示唆された。

(2)

TSP-1 に対する siRNA を 3 種類作製 (Ambion 社) し、それらの効果を、A549 細胞を TGF- β 1 で刺激した際の TSP-1 の発現を mRNA レベルで検討した。



上のグラフは刺激後 24 時間、下のグラフは刺激後 48 時間の TSP-1 mRNA の発現を定量化したものである。気道上皮細胞を TGF- β 1 (0.5 ng/ml) で刺激すると TSP-1 の発現がみられるが、その発現を 1 つの siRNA (グラフ内の TSP-1 SiRNA) で良好な抑制効果がみられるようになった。

(3)

肺線維症動物モデルは、その多くがプレオマイシン肺臓炎モデルである。しかしこのモデルは、特に一般的な気道投与の場合は肺線維症というよりも急性肺障害であるため、われわれは尾静脈投与を丹念に行なう練習をしている。また近年、劇薬のプレオマイシンの代替として FITC を用いる (経静脈投与) 方法が有用との報告があり、われわれはこの方法も試している。

前述の TSP-1 SiRNA の肺へのデリバリーシステムについて思案中であるが、現時点ではは siRNATSP - 1 投与方法を思案しながら、治療実験にとりかかったところである。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

(3)連携研究者

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Ishii H, Iwata A, et al. Desquamative interstitial pneumonia (DIP) in a patient with RA: Is DIP associated with autoimmune disorders? Internal Medicine 2009, 48: 827-830. (査読あり)
2. Ide M, Ishii H, et al. High serum levels of thrombospondin-1 in patients with interstitial pneumonia. Respiratory medicine 2008, 102: 1625-1630. (査読あり)
3. Ishii H, Iwata A, et al. Usual interstitial pneumonia associated with primary biliary cirrhosis. Respiratory medicine CME 2008, 1: 215-217. (査読あり)

〔学会発表〕(計2件)

1. 石井 寛. 特発性間質性肺炎における thrombospondin-1の発現～バイオマーカーとしてのTSP-1の検討～. 第5回呼吸器バイオマーカー研究会(2009/3/7 東京)
2. 石井 寛. 特発性間質性肺炎における thrombospondin-1の発現. 第49回日本呼吸器学会学術講演会(2008/6/16 神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 寛 (ISHII HIROSHI)
大分大学・医学部・助教
研究番号: 60398146

(2)研究分担者