

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 20 年 5 月 22 日現在

研究種目：基礎研究（C）

研究期間：2006-2008

課題番号：18590871

研究課題名（和文）各種間質性肺炎における血管、リンパ管の新生とその機序

研究課題名（英文）Angiogenesis and Lymphangiogenesis in the interstitial pneumonia

研究代表者 福田 悠（HUKUDA YUH）

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60097037

研究成果の概要：本研究では、NSIP26例・UIP18例の胸腔鏡下生検肺とDAD18例の剖検肺を用いて、肺胸腔内線維化巣の血管新生・リンパ管新生について検索した。組織学的検索にて、肺胸腔内線維化巣の血管新生はNSIPに多く、UIP、DADで少ないという結果が得られた。リンパ管新生は、NSIPではやや時間の経過した線維化部に、DADでは増殖期から線維化期の閉塞型線維化巣に比較的多く認められた。UIPにはリンパ管新生は乏しかった。また、血管内皮増殖因子（VEGF-A）とその受容体（VEGFR-2）に関する検索を行い、NSIPにおける免疫組織学的検索では、VEGF-AはII型肺胞上皮細胞の細胞質に陽性を、VEGFR-2は血管内皮細胞の細胞質に陽性を示した。Real time RT-PCR法を用いたmRNA発現の検索では、VEGF-AのmRNA発現レベルは、NSIPがUIPやDAD例より有意に高く、VEGFR-2のmRNA発現レベルは、NSIPがUIPおよびDADより相対的に高いという結果を得た。

### 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	630,000	4,030,000

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：①特発性間質性肺炎 ②血管新生 ③リンパ管新生 ④VEGF ⑤VEGFR

## 1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎は、現在、病理組織学的に7型に分類され、このうち、予後不良のものとしては、慢性進行性である通常型間質性肺炎(UIP)とびまん性肺胞傷害(DAD)がその組織パターンである急速進行性の急性間質性肺炎(AIP)がある。これまでに我々は、予後不良の病型においては、組織像の特徴に加え、肺胞腔内線維化巣に出現する線維芽細胞や細胞外基質の吸収に関連する Matrix metalloproteinase (MMP)とその阻害物質である Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)のバランスが、特発性器質化肺炎(COP)や非特異性間質性肺炎(NSIP)をはじめとする予後が良好なタイプとは異なることを報告してきた。さらに、予後良好なCOPでは肺胞腔内のポリープ型線維化巣に多くの血管の進入が認められることより、線維化の吸収には、血管新生が大きく関与することが考えられている。また、正常肺でのリンパ管の分布は広義間質内にあり、肺胞領域での分布は見られないが、間質性肺炎では、線維化領域にリンパ管の新生が認められる症例が存在し、増生するとの報告もある。血管同様、リンパ管新生も線維化の吸収に関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

今回の研究では、肺胞腔内線維化巣の吸収という点に着目し、間質性肺炎のうち、NSIP、UIP、DADの肺胞腔内線維化巣と血管新生・リンパ管新生の程度を比較・検討し、疾患の予後および病態との関連性に関して考察した。さらに、血管新生については、増殖因子のひとつである血管内皮細胞増殖因子(VEGF)とその受容体(VEGFR)についても検討を加えた。

## 3. 研究の方法

## (1) 症例

胸腔鏡下肺生検検体であるNSIP26例、UIP18例と、剖検検体である増殖期DAD18例を対象とした。この研究で使用した剖検例は死後5時間以内で、重篤な感染症のない症例を使用した。

## (2) 光顕および免疫組織化学的検索

各症例の標本は、ホルマリン固定後にパラフィン包埋・薄切し、全例にHematoxylin-eosine(HE)、Alcian blue-PAS(AI-PAS)、Elastica-Masson-Goldner(EMG)染色を行った。免疫組織化学は各病型の一部で、血管の同定には抗CD34抗体を、リンパ管の同定にはD2-40抗体を用いた。さらに、NSIP症例の一部で、抗VEGF-A抗体および抗VEGFR-2抗体での免疫染色を行った。

## (3) 判定方法

## ①血管新生

各症例で、AI-PAS染色で青染する肺胞腔内線維化巣の総数(A)と、そのうちの新生血管を有する腔内線維化巣の数(B)を確認し、線維化巣の総数に対する新生血管を有する線維化巣の割合(B/A)が50%以上の症例を+++、25-50%を++、1-25%を+、0%を-の4グループに区分し、疾患群における各グループの症例数を比較検討した。また、ポリープ型、壁在型、閉塞型といった線維化巣の型別に、血管新生を認める線維化巣の割合について比較検討した。

## ②リンパ管新生

1)の対象症例のうち、倍率100倍で、70%以上の線維化を認める視野が5ヶ所以上確認できるNSIP23例、UIP17例、DAD13例を対象とした。各症例において、本来のリンパ路である気道、血管周囲、胸膜、小葉間隔壁を除き、肺胞領域のリンパ管と同定可能な管腔を確認し、管腔の数が21本以上の視野を3、11-20本を2、1-10本を1、認めなかった視野を0とスコア化し、5視野以上で判定したスコアの累計から1視野あたりのスコアを算出し、0.15以上の症例を+++、1.0-1.49を++、0.5-0.99を+、0-0.49を-と4グループに区分し、疾患群における各グループの症例数を比較検討した。また、NSIPにおける線維化巣部の膠原線維密度をスコア化(1:密、2:やや密、3:やや疎、4:疎)・平均化し、症例ごとに、その程度と前述のリンパ管新生のスコアとの関連を比較検討した。

## (4) VEGF-A・VEGFR-2 および VEGF-C・VEGFR-3 に対する Real time RT-PCR

対象症例は、1)の対象症例のうち、NSIP3例、UIP5例およびDAD3例を対象とし、各症例の凍結肺胞組織ブロックを用いて、VEGF-A、VEGFR-2、VEGF-CおよびVEGFR-3のmRNAの発現レベルを測定し、疾患群における測定値を比較検討した。内的コントロールとしてGAPDHを使用した。

## (5) 統計学的処理

すべての値を平均値±標準誤差で表示し、一元配置分散分析で解析を行った。

## 4. 研究成果

## (1) 光学顕微鏡的検索

## ①血管新生

光顕的には、NSIPの早期腔内線維化巣には血管新生が多く認められた(図1A・1B)。それに対しUIPおよびDADの腔内線維化巣には血管新生が非常に乏しく(図1C・1D)、特にDADでは、ほとんど血管新生が認められなかった。

## ②リンパ管新生

正常肺でのリンパ管の分布は広義間質内にあり、肺胞領域での分布はみられなかった。間質性肺炎においては、NSIPでリンパ管新生

が顕著な症例が認められ、特に早期腔内線維化巣内ではなく、やや時間の経過した閉塞型腔内線維化巣のやや疎な結合織に、リンパ管内皮マーカである D2-40 に陽性なリンパ管が観察された(図 2A)。UIP ではリンパ管新生は乏しかった(図 2B)。DAD では、多くのリンパ管新生が認められ、NSIP 同様、閉塞型の浮腫性の疎な線維化巣部に多く認められた(図 2C)。

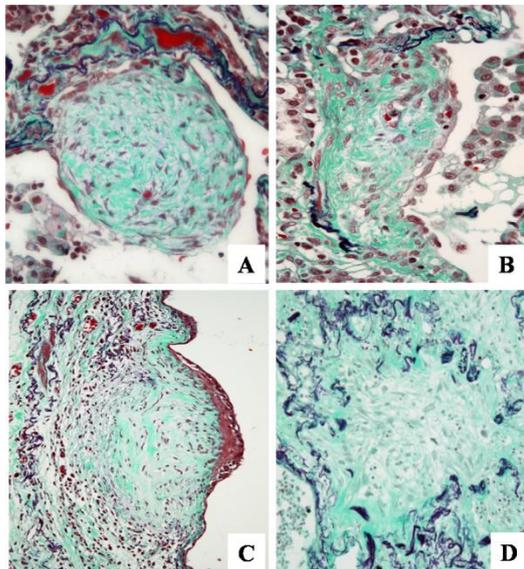


図 1 : 間質性肺炎の各疾患群における肺胞腔内線維化巣での血管新生。A, B: NSIP, C: UIP, D: DAD

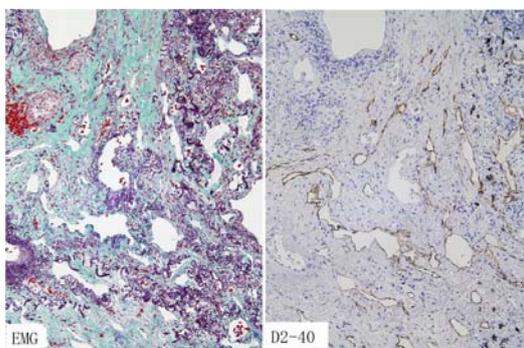


図 2A : NSIP におけるリンパ管新生像

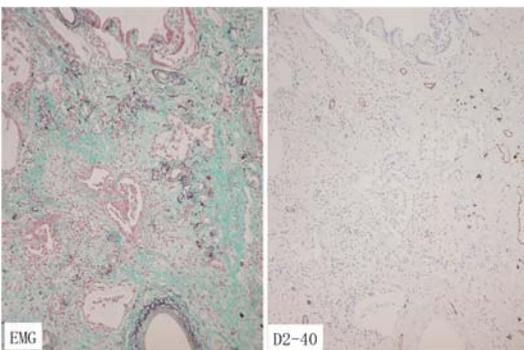


図 2B : UIP におけるリンパ管新生像

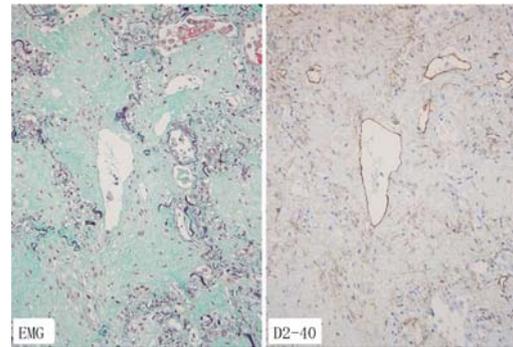


図 2C : DAD におけるリンパ管新生像

## (2) 間質性肺炎の疾患群における血管新生・リンパ管新生の比較結果

### ①血管新生

間質性肺炎の疾患群別で比較すると、NSIP では全症例に血管新生を有する早期腔内線維化巣を認め、+の症例が 10 例、++の症例が 12 例、+++の症例が 4 例だった。一方、UIP では-の症例が 4 例、+の症例が 11 例、++の症例が 3 例で、+++の症例は認めなかった。DAD においては、-の症例が 13 例、+の症例が 5 例であった。症例毎の線維化巣の総数に対する新生血管を有する線維化巣の割合を算出すると、その平均値は NSIP が  $31.39 \pm 2.97\%$ 、UIP が  $13.23 \pm 2.96\%$ 、DAD が  $1.39 \pm 0.71\%$ で、血管新生は NSIP に多く、次いで、UIP、DAD に少ないという有意差をもつ結果が得られた(図 3A)。

また、疾患群におけるポリープ型、壁在型および閉塞型といった型別での血管新生の割合は、NSIP では、3 型すべての腔内線維化巣を認め、そのうち、血管新生を認める割合はポリープ型で 33.7%、壁在型で 25.4%、閉塞型で 21.9%と、ポリープ型に多い傾向にあった。UIP は全体に壁在型、閉塞型の 2 型を認め、血管新生は壁在型にみられ、その割合は 16.5%であった。DAD では観察されたのは閉塞型、ポリープ型の 2 型で、そのうち血管新生の認められた割合は、ポリープ型で 9.0%、閉塞型では 0.3%とごくわずかであった(図 3B)。

### ②リンパ管新生

リンパ管新生における疾患群での比較結果は、NSIP ではリンパ管新生を認めない症例はなく、+の症例が 3 例、++の症例が 7 例、+++の症例が 13 例と、リンパ管新生が多く観察された。一方、UIP ではリンパ管新生を認めない症例も 3 例あり、+の症例が 9 例、++の症例が 5 例で、+++の症例は認めず、リンパ管新生は乏しいという結果となった。また、DAD は NSIP と同様にリンパ管新生を認めない症例はなく、+の症例が 6 例、++の症例が 5 例、+++の症例が 2 例であった。疾患群のス

コアの平均は、NSIP で  $1.60 \pm 0.13$ 、UIP で  $0.74 \pm 0.09$ 、DAD で  $1.22 \pm 0.15$  となり、NSIP と DAD 間では有意差は認めなかったが、いずれの群も UIP とは有意差を認め、リンパ管新生は、NSIP、DAD では多く、UIP では乏しいという結果を得た。さらに、NSIP でのリンパ管新生を観察するにあたり、腔内線維化巣に膠原線維沈着が強い密な線維化部にはリンパ管と思われる管腔形成は少なく、やや時間が経過し、膠原線維沈着も減少している疎な線維化部にはリンパ管と思われる多数の管腔を認める(図 3C)という傾向にあった。膠原線維密度とリンパ管新生の関連性の検討では、膠原線維沈着の程度ごとのリンパ管新生のスコアの平均は、密(1)で  $1.00 \pm 0.11$ 、やや密(2)で  $1.59 \pm 0.29$ 、やや疎(3)で  $1.62 \pm 0.18$  および疎(4)で  $1.56 \pm 0.22$  となった。全体の膠原線維密度が低く、疎な線維化部が多い症例ほど、リンパ管新生をより多く認め、明らかに膠原線維密度が高く、密な線維化部を多く認める症例ほどリンパ管新生数が少ないという結果が得られ、両者間には有意差も得られた。

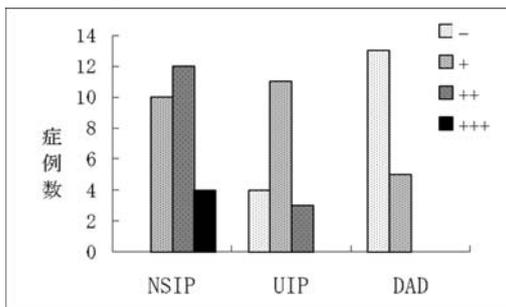


図 3A: 間質性肺炎の疾患群での血管新生の程度

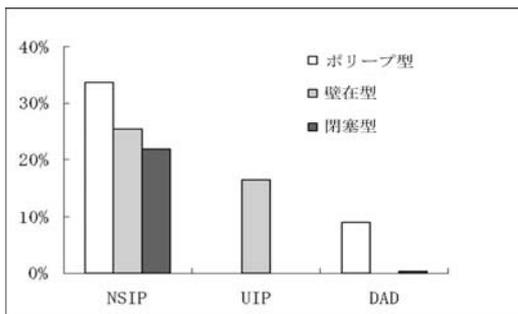


図 3B: 間質性肺炎の疾患別および腔内線維化巣の型別での血管新生の割合

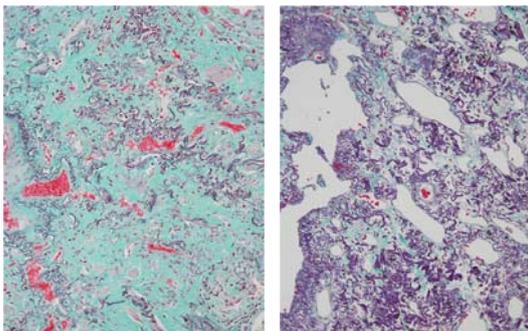


図 3C: NSIP における膠原線維沈着の程度とリンパ管新生. (左) 膠原線維沈着が強い密な線維化部にはリンパ管新生が減少している。(右) 膠原線維沈着が少ない疎な線維下部にはリンパ管新生が多い。

### (3) NSIP における VEGF-A・VEGFR-2 および VEGF-C・VEGFR-3 の免疫組織学的検索

血管新生に主な役割を果たす VEGF-A および VEGFR-2 について、免疫組織学的検索の結果、VEGF-A は再生した II 型肺胞上皮に陽性を示したが、血管内皮細胞には陰性であった(図 4A)。VEGFR-2 は再生した II 型肺胞上皮および血管内皮細胞のいずれにも陽性を示した(図 4B)。

一方、リンパ管新生に主な役割を果たす VEGF-C および VEGFR-3 について、抗 VEGF-C 抗体は再生した肺胞上皮や周囲のリンパ球に陽性を呈した(図 4C)が、抗 VEGFR-3 抗体は染色性を特定できなかった。

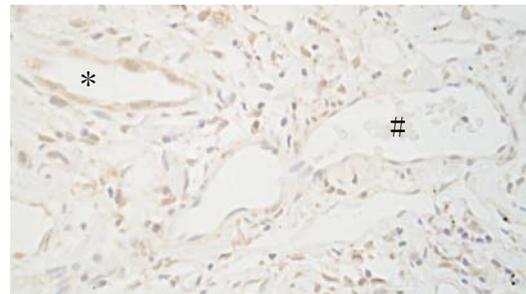


図 4A: NSIP における VEGF-A の染色性: 肺胞腔(\*)を取り巻く再生 II 型肺胞上皮は VEGF-A 陽性を示したが、血管(#)を被覆する内皮細胞は陰性を示した。

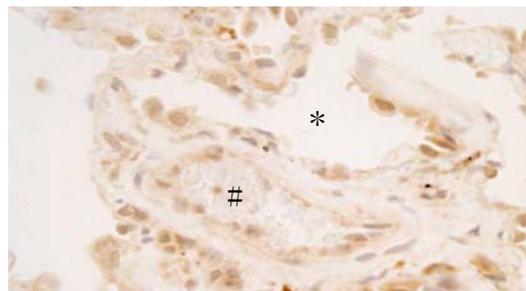


図 4B: NSIP における VEGFR-2 の染色性: 肺胞腔(\*)を取り巻く再生 II 型肺胞上皮、血管(#)を被覆する内皮細胞ともに陽性を示した。

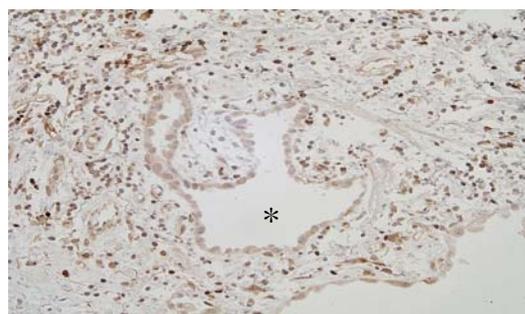


図4C: NSIPにおけるVEGF-Cの染色性: 再生II型肺胞上皮およびその周囲に認められる炎症細胞にVEGF-Cが陽性を示した。

#### (4) VEGF-A・VEGF-R2 および VEGF-C・VEGFR-3 の mRNA の発現

Real time RT-PCRにて、NSIPでのVEGF-AのmRNA発現レベルは、UIPやDADでの発現レベルより有意に高いことが示された。UIPとDADの間では、UIPでの発現レベルがDADより高い傾向にあったが、有意差は認めなかった。NSIPでのVEGF-R2のmRNA発現レベルは、UIPおよびDADでの発現レベルより高い傾向を呈したが、有意差は認めなかった。一方、VEGF-CおよびVEGFR-3のmRNA発現レベルは一定の傾向を示さなかった。

#### (5) 研究成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究で、比較的予後良好なNSIPは、予後不良なUIP、DADに比して肺胞腔内線維化巣に有意に多くの血管新生を認め、さらにやや時間の経過した膠原線維沈着の疎な線維化巣にはUIPに比して多くのリンパ管新生を認めた。以前に、NSIP、OPの肺組織中にTIMPsに比しMMPsが多く、UIPでは逆にTIMPsが多いことを報告している。今回の結果を含め考察すると、線維化の吸収・修復に、血管新生・リンパ管新生の関与が示唆された。また、DADにおいては、肺胞腔内線維化巣の血管新生は少ないが、リンパ管新生は比較的多く、増量している肺内水分の排泄への関与が示唆された。これらの結果は、間質性肺炎の病態の機序解明へつながるとともに、組織パターンの鑑別や予後予測の一因子としての役割を果たす可能性がある。

#### (6) 今後の展望

血管新生に関与する結果を得たVEGFと、細胞外基質吸入に関連するMMPやTIMP、これらを調整する転写因子(ETS-1)等の相互作用の検索により、間質性肺炎の病態の解明につなげる。

### 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)

[雑誌論文] (計1件)

① Takahashi M., Yamamoto S., Kunugi S., Ishizaki M., Fukuda Y., Significance of angiogenesis in the intra-alveolar

fibrosis, Journal of Nippon Medical School, 査読無, vol 75, 2008

[学会発表] (計4件)

① Mikiko Ono. Angiogenesis in the intra-alveolar fibrosis in the interstitial pneumonia, American Thoracic Society international conference 2007, May 19, 2007, San Francisco, California

② 小野美紀子, 石崎正通, 福田 悠. 間質性肺炎(IP)の線維化巣におけるリンパ管新生, 第96回病理学会総会, 2007年3月13日, 大阪

③ 中山智子, 福田 悠. 間質性肺炎におけるリンパ管新生の検討, 第46回日本呼吸器学会学術講演会, 2006年6月1日, 東京

④ 小野美紀子, 石崎正通, 福田 悠. 間質性肺炎(IP)の早期腔内線維化巣における血管侵入像, 第95回病理学会総会, 2006年5月1日, 東京

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

福田 悠 (Fukuda Yuh)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号 60097037

#### (2) 研究分担者

石崎 正通 (Ishizaki Masamichi)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 40096954

中山 智子 (Nakayama Tomoko)  
日本医科大学・医学部・助手  
研究者番号 50350038

#### (3) 研究協力者

高橋 美紀子 (Takahashi Mikiko)  
(旧姓 小野美紀子 (Ono Mikiko))  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号 40516077