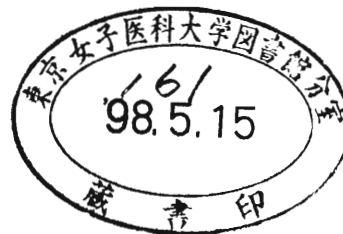


「肺の気腫化・線維化におけるコラーゲン分子特異的
シャペロンHSP47の発現と制御」

研究番号08670682

平成8年度 平成9年度科学研究費補助金（基盤C）研究報告書



平成10年3月

研究代表者 石原陽子

(東京女子医科大学医学部講師)



「肺の気腫化・線維化におけるコラーゲン分子特異的
シャペロンHSP47の発現と制御」

研究番号08670682

平成8年度 平成9年度科学研究費補助金（基盤C）研究報告書

平成10年3月

研究代表者 石原陽子
（東京女子医科大学医学部講師）

研究組織

研究代表者：石原陽子（東京女子医科大学・医学部・講師）
研究分担者：永井厚志（東京女子医科大学・医学部・教授）
研究分担者：郡 和宏（東京女子医科大学・医学部・助手）
（研究協力者：宮崎吉孝（九州大学）、Pierre Vassalli(ジュネーブ大学)、丸山良子（宮城大学）、福田康一郎（千葉大学））

研究経費

平成8年度	140千円
平成9年度	90千円
計	230千円

研究発表

(1)学会誌等

Y. Ishihara, Y. Miyazaki, P. Vasalli, J. Kagawa:
Transforming growth factor-beta-independent fibrosing
alveolitis in tumor necrosis factor- α transgenic mice.
Am J Respir Crit Care Med, in press

Y. Ishihara, Y. Miyazaki, P. Vassalli, R. Maruyama,
Y. Fukuda, J. Kagawa: A collagen-specific molecular
chaperone, HSP47, may regulate lung collagen
deposition in tumor necrosis factor- α transgenic
mice. Am J Respir Crit Care Med, in press

石原陽子:呼吸器疾患の分子生物学：分子シャペロン（ストレス蛋白質）と肺疾患、川上義和、谷口直之、木田厚瑞編、
医学書院、東京、印刷中

Y. Ishihara, A Nagai, J. Kagawa: Increase of elastolytic activity
withpit any change of effective α 1-antitrypsin and change of oxide
reductases in rat bronchoalveolar lavage fluid as mechanisms of
mineral dust-induced emphysema. Inhal Toxicol 9:753-773, 1997

Y. Ishihara, A. Nagai, J. Kagawa: Comparison of the effect of exposure to filter cigarette and nonfilter cigarette smoke in rat bronchoalveolar lavage fluid and blood: The antioxidant balance and protease-antiprotease balance in vivo, *Inhal Toxicol* 9:273-286, 1997

K. Kohri, Y. Ishihara, A. Nagai, Y. Miyazaki, P. Vassalli, J. Kagawa: The collagen-binding stress protein HSP47 gene is suppressed on lung fibrosis in tumor necrosis factor- α transgenic mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 155:A569, 1997

石原陽子、郡和宏、宮崎吉孝、Pierre Vassalli、永井厚志、香川順：TNF- α 過剰発現トランスジェニックマウスの肺線維化とコラーゲン結合ストレス蛋白HSP47の遺伝子発現. 東京女子医科大学総合研究所紀要、17:35-36、1997

郡 和宏、石原陽子、永井厚志、香川 順：TNF- α 過剰発現トランスジェニックマウスの肺線維化におけるコラーゲン特異的ストレスタンパクHSP47遺伝子発現の検討. 日胸疾会誌、35:増刊号、249、1997

Y. Ishihara, A. Nagai, J. Kagawa: The role of protease, oxide reductase and transforming growth factor β 1 during the development of pulmonary fibrosis in crystalline silica-treated rats. *J Invest Med*, 44:24A, 1996

石原陽子、永井厚志、香川 順：タバコ煙成分の線維芽細胞、血管内皮細胞に対する影響. 日胸疾会誌、34:増刊号、110、1996

石原陽子、香川 順：タバコ煙の健康影響-第7報喫煙の生体影響機構の解明、日衛会誌講演集、51:392、1996

Y. Ishihara, A. Nagai, J. Kagawa: Expression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene in blomysin-treated mouse. *FASEB J*, 10:A27, 1996

(2)口頭発表

石原陽子、宮崎吉孝、丸山良子、郡和宏、福田康一郎、
香川順：TNF- α 過剰発現による肺の線維化とコラーゲン
特異的分子シャペロンの発現と制御、日本呼吸器学
会総会、1998年3月

Y. Ishihara, Y. Miyazaki, P. Vassalli, R. Maruyama,
Y. Fukuda, J. Kagawa: A collagen-specific molecular
chaperon, HSP47, may regulate lung collagen deposition
in tumor necrosis factor- α transgenic mice, American
Lung Association/ American Thracic Society
International Conference, 1998年4月

Y. Ishihara, Y. Miyazaki, P. Vassalli, J. Kagawa:
Transforming growth factor- β -independent fibrosing
alveolitis in tumor necrosis factor- α transgenic mice,
American Lung Association/ American Thracic Society
International Conference, 1998年4月

郡 和宏、石原陽子、永井厚志、香川 順：TNF- α 過
剰発現トランスジェニックマウスの肺線維化における
コラーゲン特異的ストレスタンパクHSP47遺伝子発現
の検討. 日本胸部疾患学会総会、1997年4月

K. Kohri, Y. Ishihara, A. Nagai, Y. Miyazaki, P. Vassalli,
J. Kagawa: The collagen-binding stress protein HSP47
gene is suppressed on lung fibrosis in tumor necrosis
factor- α transgenic mice. American Lung Association/
American Thracic Society International Conference,
1997年5月

石原陽子、永井厚志、香川 順：タバコ煙成分の線維
芽細胞、血管内皮細胞に対する影響. 日本胸部疾患学会
総会、1996年4月

石原陽子、香川 順：タバコ煙の健康影響-第7報喫煙の
生体影響機構の解明. 日本衛生学会総会、1996年5月

Y. Ishihara, A. Nagai, J. Kagawa: Expression of the
collagen-binding stress protein HSP47 gene in

bleomycin-treated mouse. Experimental Biology
'96, 1996年5月

研究成果

[研究目的]

最近では肺癌や肺炎・気管支炎等の呼吸器疾患による高齢者死亡率の急増が見られる。この一因に、大気汚染、喫煙等による慢性閉塞性肺疾患(COPD, COLD)患者の増加がある。慢性閉塞性肺疾患患者の肺組織所見として、気腫化と線維化病巣の並存が見られ、その病状は緩徐かつ慢性的に増悪傾向を辿り、感染等によって死に至る。50歳以降から加齢と共に急増する本疾患の発症と進展メカニズムの解明は、超高齢化社会及び医療費高騰抑制の上でも大きな課題となるであろう。

肺気腫の機序として、欠損遺伝子家系の検討から、プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説が提唱されてきたが、我々のこれまでの研究で、ヒト及び動物のタバコ肺気腫でこの仮説を裏付ける所見は得られていない。肺の線維化においても、各種サイトカイン、特にTGF- β のプロモータとしての関与が指摘されているが、肺線維症誘導トランスジェニックマウスの遺伝子レベルでの解析では、TGF- β の有意な発現は観察されておらず(1)、いずれも両病態の主因子ではないことを示唆している。

報告者らはこれまでの、シリカ、ブレオマイシン、石綿等を用いた肺線維化モデル、動物喫煙実験及びCOPD患者の生化学的、肺病理所見から、肺の線維化・気腫化の発症及び進展過程には、肺間質細胞の分化やコラーゲン代謝が深く関与している可能性を見いだした。永田ら(2)によって報告された、ヒートショックによって発現するストレス蛋白質HSP47は、線維芽細胞の小胞体に存在するコラーゲン特異的分子シャペロンであり、プロコラーゲンのプロセッシング、三重鎖ヘリックス形成、小胞体からゴルジ装置へのプロコラーゲン分泌に関与していることが示唆されている。最近増田ら(3)は、実験的肝線維化モデルを作成して、肝細胞のHSP47発現と肝線維化の関連性を検索したところ、

明らかな相関関係を認めたことを報告している。しかしながら、HSP-47と肺疾患との関連性を探索した報告は、国内・外では未だ見られない。そこで、報告者らは肺の線維化・気腫化とHSP47発現の関係について、動物モデルを用いて下記の項目を検討した。

1. 肺の気腫化と線維化病巣の並存におけるHSP47の関与を明確にする。
2. HSP47の肺発現量と肺線維化・気腫化の発症及び進展メカニズムとの関連性を明確にする。
3. HSP47が可逆性及び不可逆性肺線維化の規定因子の一つとなりえるか確認する。
4. HSP47の分子レベルでの発現量を調節することにより、肺マトリックス及び正常な肺構築の保持が可能であるか検討する。
5. HSP47遺伝子の制御による治療の可能性を探索する。

[実験 1]

肺の気腫化と線維化病巣の並存及びその発症・進展におけるHSP47の関与を明確にするために、モデル動物を作成した。肺の線維化及び気腫化モデルとしてブレオマイシンの腹腔内投与マウスとタバコ煙長期暴露マウスを作成し、肺HSP47遺伝子発現量を経時的に検討した。

[実験方法]

ブレオマイシン肺臓炎モデルの作成(4)：4週齢のC57black/6N雄性マウスを1週間予備飼育後、ブレオマイシン0.1mg/mlを隔日0.2-0.4ml、総投与量2mg/匹/2週まで腹腔内投与した。対照群には、同量の生理食塩水を腹腔内投与した。ブレオマイシン投与群と対照群は、経時的に屠殺して、肺組織のHSP47発現量と肺コラーゲン量を測定した。

喫煙暴露モデルの作成(5)：4週齢のC57black/6N雄性マウスを1週間予備飼育後、暴露チャンバーを用いて両切りピース6本/30分/日、週5日間暴露した。その際の暴

露チャンパー内NO, NO₂, CO, CO₂, O₂濃度の30分間の
平均値はそれぞれ、<1 ppm, <1-2 ppm, <0.1%,
0.86+0.08%, 19.0-19.5%であった。対照群は、清浄空
気下で飼育された。暴露及び対照マウスは、経時的に
屠殺して、肺組織のHSP47発現量と肺コラーゲン量を
測定した。

肺組織RNA抽出：マウスはネンブタール麻酔下で屠殺
し、左肺を液体チッソで急速凍結してRNA抽出操作ま
で-80°下で保存した。肺組織は、GIT buffer中でホモ
ジナイズ後、CsCl bufferに重層し、38000r.p.m.で18時
間遠心した。沈査を飽和フェノール液に溶解して、エ
タノール抽出を行った後、吸引乾燥した。抽出した
RNAは、DEPC処理精製水に再溶解して、吸光度260nm
でRNA量を測定した。

HSP47DNAプローブの作成：京都大学胸部疾患研究
所永田和宏教授より恵与された、マウスHSP47(mouse
HSP47 F2)プローブを用いて、HindIII-EcoRI1.5kbと
HindIII-XhoI0.9kb断片のプローブ用DNAを作成した。
肺組織HSP47遺伝子発現量の測定(Northern blotting)：
1%アガロースゲルでRNAを電気泳動後、ニトロセルロ
ースメンブランに転写した。メンブランをUVクロスリ
ンカーを用いて固定後、ハイブリタイゼーションを行
った。メガプライムDNA標識は、Random primer kitを
用いて[α-P³²]dCTPでラベリングを行い、pushu column
で精製した。次いで、メンブレンをハイブリバッファ
ー液と1時間シェーキング後、ラベリングしたDNAプ
ローブとさらに1時間インキュベーションを行った。続
いてメンブレンをbufferで洗浄して、カセットにX線フ
ィルム及び増感紙と共にセットし、-80° Cでオートラ
ジオグラフィーを行った。

肺組織コラーゲン量の測定：測定まで-80° Cで保存し
た片肺を、10%TCA buffer中でホモジナイズ後、遠心し
て上清を除去した。沈殿物を6NHClに再溶解させ、110°
C 12時間オートクレーブで加水分解した。完全に加水
分解されたことを確認後、遠心して上清の一部を80° C

のホットプレートで蒸発乾固した。測定時に、サンプルは0.001N HClに再溶解して、エーリッヒ試薬を用いてオートアナライザーによって吸光度550nmで hydroxyproline (HOP)量を測定した。

[実験結果]

Fig.1,2に、肺HOP量の経時的変動を示した。ブレオマイシン投与群では、投与終了4週後からHOP量の増加が認められた。一方、喫煙群では、暴露12週目で軽度な増加を認めたが、1年間暴露ではやや減少する傾向が認められた。

Fig.3-5に、ブレオマイシン投与群と対照群の肺HSP47遺伝子発現量の経時的変動を示した。ブレオマイシン投与開始後3-4週後にHSP47遺伝子発現量の一過性の上昇を認めたが、その後は同月齢の対照群と比較して明らかな遺伝子発現量の増加を認めなかった。ブレオマイシン肺臓炎に伴う肺線維化は、病理所見ではブレオマイシン投与4週後から観察され、経時的に増悪した。その程度は、Fig.1に示したHOP増加と一致するが、HSP47遺伝子発現はHOPの増加が顕著に認められる投与後10-12週では増加を認めず、むしろHOP増加開始時期に一過性の変化を示したに過ぎなかった。

Fig.5-7に、喫煙暴露開始4日後から6か月までの肺HSP47遺伝子発現の経時的変動を示した。対照群と比較して短期及び長期喫煙暴露による肺HSP47遺伝子発現の明らかな増減は認めず、図に示していないが暴露1年後の肺HSP47遺伝子発現にも明確な変動は認めなかった。

以上の成績から、可逆性肺線維化モデルとしてのブレオマイシン肺臓炎では、HOP増加時期、つまり線維化開始初期に一過性の上昇を示すものの、長期喫煙暴露ではHSP47遺伝子の関与を認めなかった。増田ら(3)は、肝線維化の進展とHSP47発現が一致することを報告しているが、本実験では肺のコラーゲン量とHSP47

発現量との明らかな相関は認めなかった。この結果は、肝線維芽細胞と肺線維芽細胞ではHSP47発現に差異が見られることを示していた。

そこで2.5か月齢正常マウスと2か月齢TNF- α 過剰発現肺線維化マウス(Tgマウス)の肺、肝、心臓でのHSP47発現量を検討した。その結果、Fig. 8に示すように、2-2.5か月齢マウスではHSP47遺伝子発現は正常マウス及びTgマウスの肝臓ではほとんど認めないのに対して(line 3, 6, 9)、肺と心臓では非ストレス負荷状態においても遺伝子発現が見られることが判明した。Fig. 9にBAStation resultを示した。心と肺組織ではほぼ同程度のHSP47遺伝子発現量を示していた。これらの成績は、HSP47遺伝子発現は臓器特異性が高いことを裏づけるものと考えられた。

肺組織の間質コラーゲンは、肺構築を保持するための主要な構成成分の一つであり、加えて肺ではコラーゲン分解酵素も豊富なことから、常にコラーゲン代謝が活発に行われている可能性が高い。その結果、線維芽細胞でのプロコラーゲン産生・分泌は、肺傷害に対しても高い抵抗性をもつ可能性が考えられる。それゆえに、本動物モデルで見られる可逆的線維化や前肺気腫様程度では、HSP47遺伝子はそれほど影響されないことが考えられた。そこで、TNF- α 過剰発現によって著しい肺線維化を招来するトランスジェニックマウスを入手して実験を行うことにした。

[実験 2]

TNF- α 過剰発現肺線維化モデルとしてのトランスジェニックマウス(Tg)を用いて、経時的に肺線維化とHSP47遺伝子発現の関係について検討した。対照群としては、同一母マウスから生まれたnon-Tgマウスを用いた。

TNF- α 過剰発現マウスの作成：既に宮崎ら(1)により報告されているhuman surfactant protein Cのpromoter制御下にTNF- α を過剰発現するマウスを、C57Black/6N

雌性マウスを用いて繁殖させ、生後4週目に尾静脈より採血を行い、DNAをGen Trapping by Liquid Extraction Kit (Takara Bilmedicals, 瀬田、滋賀) によって抽出した。続いてプライマーを用いた常法のPCRを行い、TNF- α 遺伝子の過剰発現の有無を確認した。

肺組織HSP47遺伝子発現の検討：ほぼ同時期に生まれたTg及びnon-Tgマウスを経時的に屠殺して、上述の方法によってNorthern blottingを行った。

Western blottingによるHSP47蛋白質の測定：
Northern blottingに用いた反対側の肺組織を用いてWestern blottingを行った。肺組織は、EDTA, N-ethylmaleimide, Leupeptin, pepstatin, Nonidet p40, phenylmethyl sulfonyl fliotideを含む50mM Tris-HCl buffer中で、ポリトリンホモジナイザーによってホモジナイズした。12000r.p.m.で冷却遠心後、上清を用いてLowry法によって蛋白量を測定した。サンプルは、1レーン当たり蛋白量100 ugで、10%SDSゲルを用いて常法に従って電気泳動を行い、続いてセミドライ式プロテイング法によってpoly vinylidene difluorideメンブレンにプロテイングした。転写後、メンブレンは10%スキムミルクPBS bufferでブロッキングして、免疫染色を行った。一次抗体は、3種のマウスHSP47抗体を用いて検討し、希釈倍率を10-100倍とした。二次抗体は、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラットIgG抗体(Southern Biotechnology, US)を用い、希釈倍率の検討から5000倍希釈とした。検出試薬は、ECL Western blotting detection reagent(Amersham, US)を用いて蛍光発色させ、X線フィルムに感光した。

肺組織コラーゲン量とエラスチン量の測定(6)：肺組織コラーゲン量は、前述のエーリッヒ試薬を用いた方法でhydroxyplorine量をオートアナライザーで測定した。エラスチン量はその加水分解物であるデスモシン及びイソデスモシンを、Nucleosil C-18カラムを用いた高速液体クロマトグラフィによって、0.1 M CH₃SO₃H (pH2.0)/CH₃CN=0/10(6 mM heptane sulfonate)の展開溶

媒を使用して測定した。

肺組織のコラーゲン、TGF- β 、PPM-1のmRNA発現量の検討：肺組織RNAを用いてRT-PCR法によって各種コラーゲン、線維芽細胞増殖因子TGF- β 及びmatrix metalloprotease (PPM-1)の遺伝子レベルでの発現への影響を検討した。RNAは、Superscript preamplification system (BRM, US)を用いて1st strand cDNA合成を行った後、各種プライマーを用いてPCRを行った。PCR産物は、2%アガロースゲルで電気泳動し、メチルプロマイド染色後、紫外線下でポラロイド撮影を行った。泳動用標準マーカとしては、 ϕ x174-Hae IIIを用いた。使用したオリゴヌクレオチドプライマーをTable 1に示した。94° C、1minのdenaturation, annealingは54° C、1min (α (I)procollagen, collagen type(IV), TGF- β , β -actin), 55° C、2min (collagen III), 55° C、1min (MMP-1), extensionは72° C、1min (α (I)procollagen, collagen IV, TGF- β , β -actin), 72° C、2min (collagen III, MMP-1)でPCRを行ない、サイクル数は β -actinで27サイクル、その他は30サイクルとした。

気管支肺胞洗浄液中total elastolytic activityの測定：コラーゲン及びエラスチン分解酵素活性の程度を知るために、total elastolytic activityを測定した。気管支肺胞洗浄液は、ペントバルビタール麻酔下でマウスの気管にカニューレを挿入固定して、生理食塩水1mlで気管支肺胞領域を3回洗浄した。その後、1500r.p.m.で5分間遠心し、上清中の活性を片桐らの方法(7)によって測定した。

肺病理像の検討：肺組織は、1-12か月まで経時的にグルタール固定を行い、3-5ミクロン切片を作成してHE及びマッソン-トリクロム染色によって肺の線維化を確認した。

肺換気パターンの検討：生後1か月より経時的に、マウス用body box plethysnography systemを用いて、一回換気量、呼吸数、分時換気量等の換気パターンを測定し

た。

[実験結果]

Tgマウス肺のHOP量の増加をFig.10に、肺デスモシン・イソデスモシン量をFig.11に示した。肺HOP量は生後1-2月齢まで加齢と共に増大し、その後一定値を保持した。又、HOPの増加と共に肺総デスモシン量も著増していた。生後6か月のTg及びnon-Tgマウス肺の病理像をFig.12-21に示した。経時的な病理所見は、生後1か月では肺胞壁内に多数の細胞浸潤、炎症所見を認めるが線維化巣は観察されない。生後2か月より、肺胞構造の改変と肺胞壁の著明な線維性変化、肺胞腔内におけるdesquamative changeを認め、この病変は生後2-4か月が最も著明であり、それ以降の繊維化病変の進展は緩慢で、生後6か月と12か月ではほぼ類似した病変を示した。その際の肺換気パターンは、生後4週齢マウスではnon-TgとTg群間で一回換気量、呼吸数はほぼ同程度であり両群間で明確な差を認めない。Table 2に示すように、生後11-12週齢ではTg群でnon-Tg群に比較して明らかに呼吸数の増加を認めた。生後6か月ではさらにTg群での呼吸数の増加が観察されたがその程度は生後12か月とほぼ同じ変動率であり、代償性肺機能が働いている可能性が示唆された。これまでの肺換気パターンの検討では、生後6か月まで換気パターンの増悪が観察されるが、それ以降はほぼ一定又はやや改善される傾向が認められた。Tgマウスは、non-Tgマウスとほぼ同程度の寿命(1.5-2年)を示した。

Fig.22に、Tg及びnon-Tgマウスの経時的な肺HSP47遺伝子発現の変動を示した。Tgマウスでは、non-Tgマウスと同様に生後4か月目までHSP47遺伝子発現が認められたが、生後5か月のTgマウスでは遺伝子発現の抑制が認められ、生後10か月のTgマウスでも5か月マウスと同程度であった。左肺と右肺でのHSP47遺伝子発現の比較をFig.23に示したが、両側肺で同様な結果が得られた。BAStation resultをFig.24に示したが、5か月齢のTgと

non-Tgマウスでの発現量を比較するとTgのHSP47遺伝子発現量は、1/4から1/5程度まで抑制されていた。

HSP47蛋白発現の結果をFig. 25に示した。Tgマウスでは生後1-4か月齢までHSP47蛋白(47Kd)の発現を認めるが、生後5か月齢ではその蛋白量は著しく低下していた。この結果は、肺HSP47遺伝子レベルでの発現量の増減と一致する結果であった。

肺間質のコラーゲン沈着量は、線維芽細胞からのプロコラーゲンの産生・放出と各種蛋白分解酵素によるコラーゲン分解の均衡によって調節されていると考えられる。肺病理像では、Tgマウスの肺間質に炎症細胞、特に肺胞マクロファージや好中球の遊走粘着が明確であることから、Tgマウス肺ではこれらの細胞から放出されるプロテアーゼ酵素によるコラーゲン、エラスチン分解が局所で亢進している可能性がある。それにも関わらず、コラーゲン沈着の亢進がみられることは、コラーゲン、エラスチン分解の速度を越えたコラーゲン分泌促進あるいはプロテアーゼ酵素阻害物質の増加による分解能の低下が考えられた。

そこで、気管支肺胞洗浄液中のtotal elastolytic activityを測定したところ、生後5か月のnon-Tgマウスではtotal elastolytic activityは1nM/hr/mg protein以下であったのに対して、同月齢のTgマウスのそれは3.2nM/hr/mg proteinでやや高値であった。又、気管支洗浄液中に多量の好中球増加を認めたnon-Tgマウスのそれは44.3nM/hr/mg proteinであった。

Fig.22と同一サンプルを用いた、RT-PCR法によるコラーゲン遺伝子発現の結果をFig.26-28に示した。 α (I)procollagen遺伝子発現は、non-Tgマウス肺では低いですが、Tgマウスでは明らかに発現量の増加が認められた。しかしながら、生後1か月から10か月ではその発現量に明確な差異を認めなかった。collagen type IIIは、non-Tg及びTgマウスで遺伝子発現が認められたが、non-Tgに比しTgで発現量の抑制傾向を示した。又、Tgマウスでは、1か月齢から5か月齢に比較して10か月齢

で発現量が低下する傾向が認められた。collagen type IV遺伝子発現は、non-Tgに比較してTgの1から3か月齢で明確な発現量の増加が認められ、4か月以降では低下したが、その程度はほぼnon-Tgと同じであった。

肺のTGF- β 遺伝子発現(Fig.29)は、Tgマウスの1-10か月齢では明確な増減を認めず、ほぼnon-Tgと同程度の発現量を示した。肺間質メタロプロテアーゼ(MMP-1)遺伝子発現(Fig.30)は、同週齢のnon-Tgマウスに比較してTgマウスで発現量の低下を認めたが、5か月-10か月齢ではほぼnon-Tgマウスと同程度の発現量であった。

[考察]

1. 肺の気腫化と線維化病巣の並存においてHSP47は関与しているか？

本実験で用いた肺線維化と気腫化並存モデルではHSP47の明確な関与を示唆する明らかな所見を認めなかった。その原因として、長期喫煙暴露モデルでの肺の気腫化と線維化は軽度であり、本実験の病理所見では線維化像は認めなかった。今後、短期間で肺の気腫化と線維化が発現するシリカ等による実験モデルを作成し、さらに検討する必要がある。肺線維化に関しては肺線維症Tgマウスを用いた実験から、HSP47が何らか肺線維化に関与している可能性を示唆する所見が得られた。

2. HSP47の肺発現量と肺線維化・気腫化の発症及び進展メカニズムとの関連性。

喫煙モデルでは、肺気腫発症へのHSP47の関与を示唆する所見は得られなかった。ブレオマイシン投与マウスの可逆的肺線維化においては、一過性のHSP47遺伝子発現を認め、非可逆的線維化モデルであるTgマウスでは肺線維化発症よりもむしろ進展過程でHSP47遺伝子発現の抑制が観察された。この結果は、非可逆的及び可逆的肺線維化の発症及び進展へのHSP47の関与を示唆する所見と考えられた。

3. HSP47が可逆性及び不可逆性肺線維化の規定因子の一つとなりえるか。

可逆性肺線維化モデルであるブレオマイシン肺臓炎と不可逆性肺線維化モデルとしてのTNF- α 過剰発現肺線維化モデルの実験を比較した場合、可逆性肺線維化モデルでは、HSP47遺伝子発現量は一過性であったが、不可逆性肺線維化モデルではHSP47発現の明確な抑制が見られたことから、HSP47はその規定因子の一つとなりえる可能性が見いだされた。

4. HSP-47の分子レベルでの発現量を調節することにより、肺マトリックス及び正常肺構築の保持は可能か。

ヒトの非可逆的な肺線維症は、一般には病状は増悪傾向を辿り、死に至る。本実験で用いた非可逆性肺線維化モデルでは、肺換気パターン、肺HOP、病理所見で肺線維化がある程度進展した時期にHSP47遺伝子発現が抑制され、その状態が1年後まで保持された結果から、HSP47の発現量を調節することによって線維化進展を制御出来る可能性が見いだされた。その上、Tgマウスがnon-Tgマウスとほぼ同程度の寿命期間を示すことから、HSP47遺伝子制御による肺マトリックス及び正常な肺構築への修復は不能ではあるが、進展を抑制することによって代償性肺呼吸機能が保持できる程度に制御できる可能性が示唆された。

5. HSP47の調節による遺伝子治療の可能性。

上述した実験成績から、HSP47遺伝子発現量の制御によって、ヒトにおいても肺線維化の進展を抑制出来る可能性が見いだされた。

以上の実験成績から、肺マトリックスを構成するコラーゲンの間質への沈着を調節していると考えられる分子シャペロンHSP47は、臓器特異性が高く、遺伝子レベルの制御によって肺の線維化進展を阻止できる可

能性が示唆された。しかしながら、これらの結果は又、肺間質へのコラーゲン沈着は線維芽細胞でのコラーゲン産生・分泌とそれらを分解する酵素との均衡によって調節されていると考えられる。それゆえに、HSP47遺伝子が関与するプロコラーゲンの細胞内での挙動は細胞マトリックスからの情報によって調節されている可能性が高いが、細部については不明である。今回得られた成績で、肺線維化モデルのTgマウス肺の初期にMMP-1遺伝子発現が低下とcollagen IV遺伝子の発現量の増加を認めたことは、コラーゲン産生・分泌の亢進とコラーゲン分解能の低下によるコラーゲン沈着を推定させる興味ある所見と言える。本実験では、肝線維芽細胞と異なり肺線維化の加速時にはHSP47の過剰発現は認めず、線維化とHSP47発現の相関性を認めなかった。又、肝線維化モデル動物では、HSP47遺伝子発現量とI型とIII型collagen遺伝子発現量の間に関関が見られると報告している(3)が、Tgマウス肺の線維化ではI型及びIII型よりむしろIV型collagen遺伝子発現とHSP47遺伝子量間に相関が見られた。この結果は、HSP47遺伝子発現の線維芽細胞特異性や他の要因の関与を示唆するものと思われる。

TNF- α 過剰発現肺線維化モデルでは、これまで肺線維化と関連性が深いとされているTGF- β 遺伝子の過剰発現を伴わないことから、本線維症はTGF- β 依存性myfibroblastの関与が少ない肺線維化モデルであることが示された。又、肺組織のcollagen遺伝子発現とHSP47遺伝子発現の相関性では、I型、III型よりもむしろIV型collagenとの間に相関が認められ、線維芽細胞内でのcollagen代謝にHSP47以外の分子シャペロンの関与も示唆されよう。

今後の課題

1. ヒト肺線維症へのHSP47遺伝子の関与を明確にする。
2. 正常及び疾患モデル動物でHSP47遺伝子を制御することによって、肺の線維化、肺機能、病理所見がどのような影響を受けるかを検討する。
3. 培養線維芽細胞及び肝線維症と肺線維症におけるHSP47遺伝子の挙動の差異を明確にし、その差異の要因を明確にする。
4. TGF- β 非依存性線維芽細胞とTGF- β 依存性線維芽細胞におけるHSP47遺伝子発現量の差異を明確にする。
5. コラーゲン遺伝子発現とHSP47遺伝子発現の関連性を明確にする。
6. 細胞マトリックスへのコラーゲン沈着量と線維芽細胞内HSP47遺伝子の関係を明確にする。
7. コラーゲン産生・分泌能と分解能の均衡とHSP47遺伝子発現の相関を明確にする。
8. HSP47遺伝子の肺の気腫化への関与について他の動物モデルを用いて詳細に検討し、これを明らかにする。
9. 肺組織免疫染色法によってHSP47遺伝子の発現部位を明確にする。

引用文献

1. Miyazaki Y, Araki K, Vesin C, Garcia I, Kapanci Y, Whitsett JA, Piguet PF, Vassalli P: Expression of a tumor necrosis factor- α transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. *J Clin Invest*, 96:250-259, 1995
2. Nagata K, Saga S, Yamada KM: A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts in a novel heat shock protein. *J Cell Biol*, 103:223-229, 1986
3. Masuda, Fukumoto M, Hirayoshi K, Nagata K: Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene and the $\alpha 1(I)$ and $\alpha 1(III)$ collagen genes in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest*, 94:2481-2488, 1994
4. Harrison JH, Lazo JS: High dose continuous infusion of bleomycin in mice: A new model for drug-induced pulmonary fibrosis. *J Pharm Experi Therapy*, 243:1185-1194, 1987
5. Ishihara Y, Nagai A, Kagawa J: Comparison of the effect of exposure to filter cigarette and nonfilter cigarette smoke in rat bronchoalveolar lavage fluid and blood: The antioxidant balance and protease-antiprotease balance in vivo. *Inhal Toxicol*, 9:273-286, 1997
6. Seyama Y, Inoue H, Iwata M, Watanabe H, Irie M, Orimo H, Yamashita S: Improved rapid and simple determination of desmosine and isodesmosine by high-performance liquid chromatography. *Jap J Clin Chem*, 16:38-47, 1987
7. Ktagiri K, Ito K, Miyaji M, Takeuchi T, Yoshikane K, Sasaki M: Scicyl trialanine-p-nitroanilide-hydrolytic enzymes in human serum. An improved method for clinical diagnosis. *Clin Chem Acta*, 95:401-404, 1979

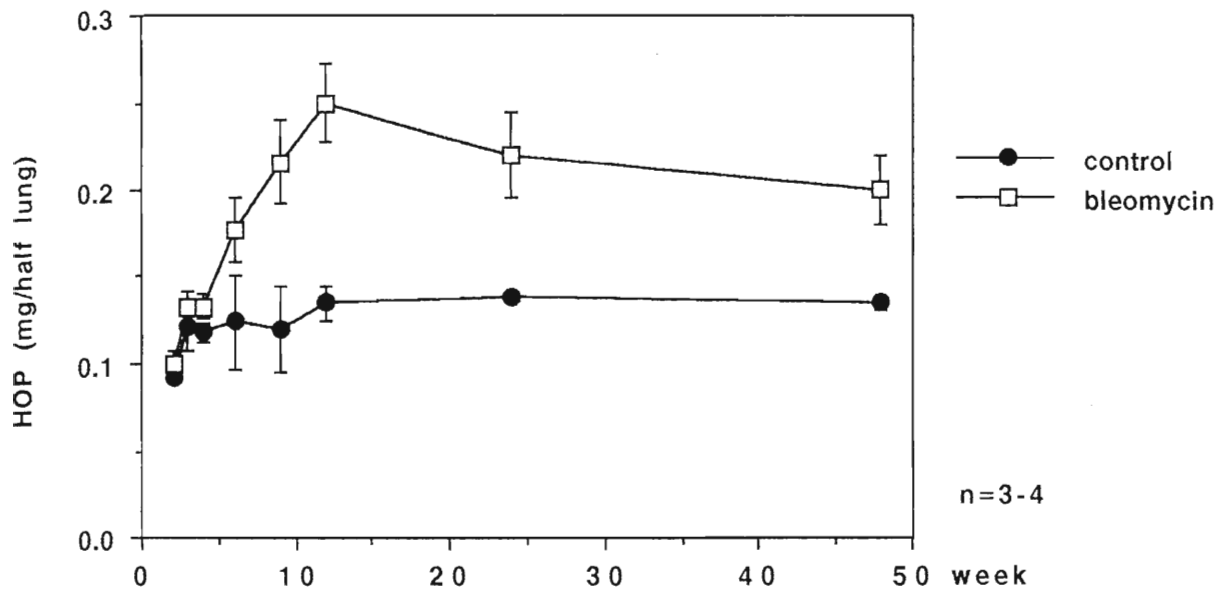


Figure 1 Chronological changes of lung hydroxyproline contents in bleomycin-treated mice

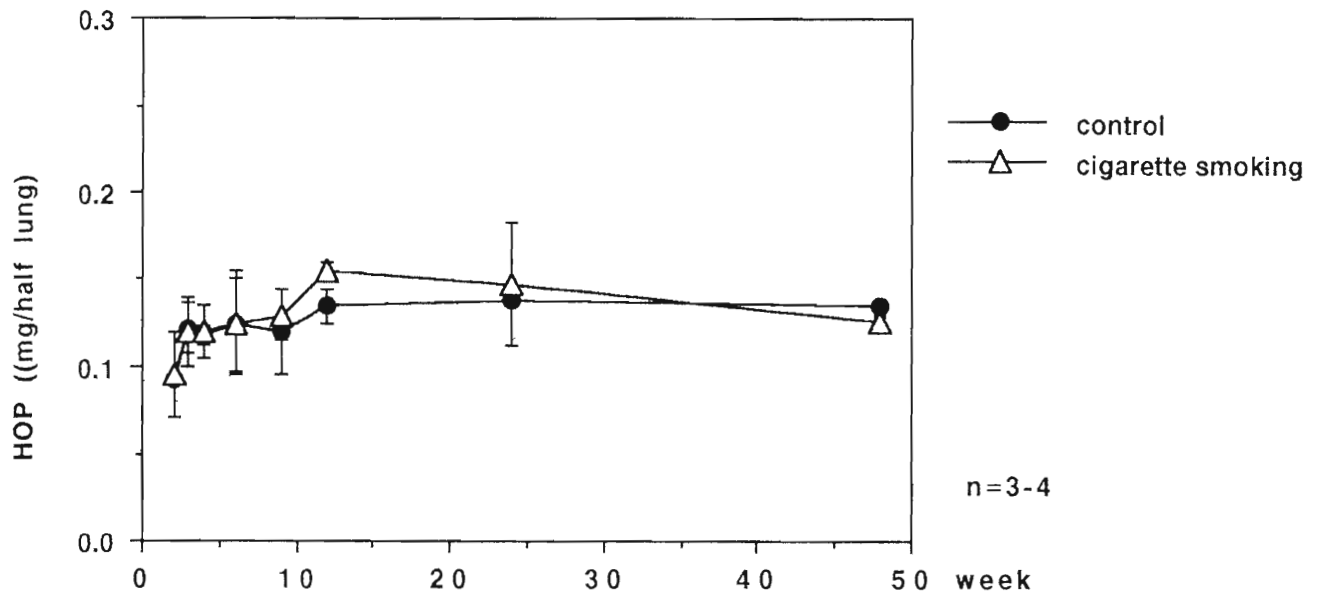
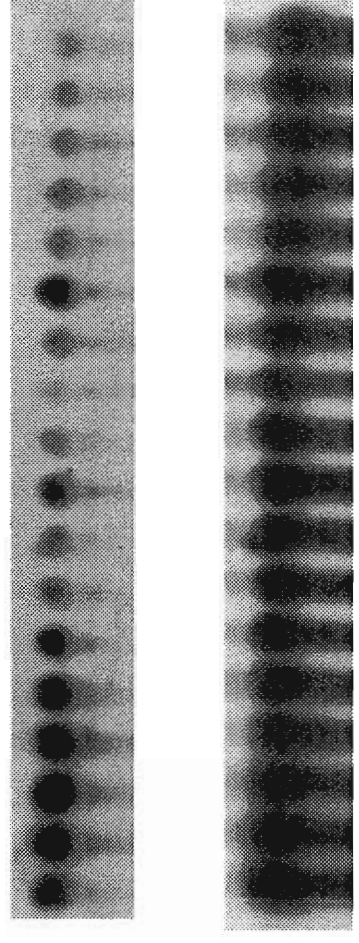


Figure 2 Chronological changes of lung hydroxyproline contents in cigarette smoke-exposed mice

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

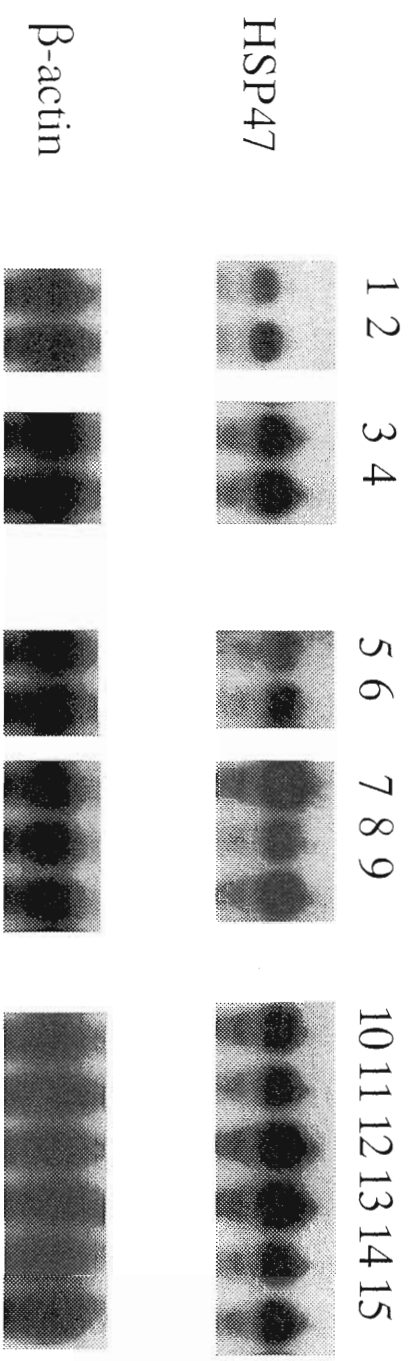


HSP47

β-actin

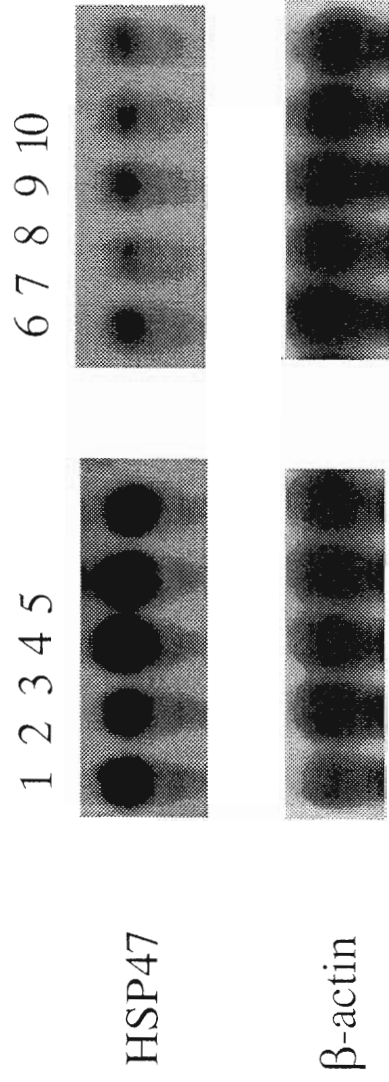
line 1-3: 2W Bleomycin, line 4-6: 2W control, line 7-9: 1W bleomycin, line 10-12: 1W control, line 13-15: 4 day Bleomycin, line 16-18: 4 day control

Figure 3 Lung HSP47 gene expression between day 4 and week 2 after bleomycin treatment in mice



line 1 & 2:3W control, line 3 & 4: 3W Bleomycin, lines 5 & 6: 4W control, line 7- 9:4W Bleomycin, line 10-13:6W control, line 13-15: 6W Bleomycin

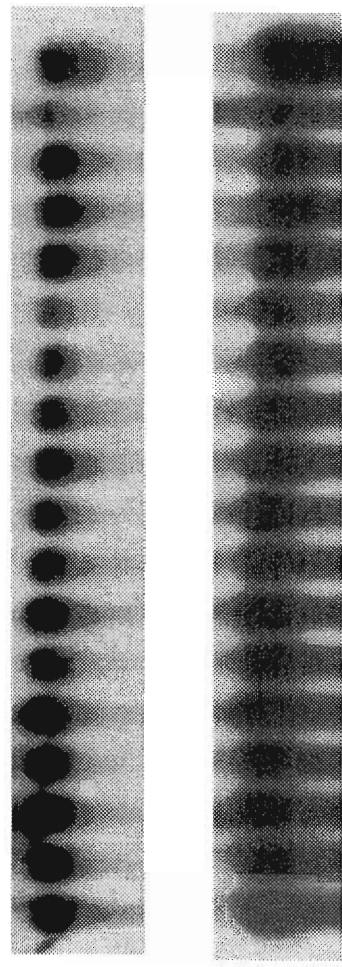
Figure 4 Lung HSP47 gene expression at weeks 3,4 and 6 after bleomycin treatment in mice



line 1-2:1M Bleomycin, line 3-5: 1M control,
 line 6-7:3M Bleomycin, line 8-10: 3M control

Figure 5 Lung HSP47 gene expression at 1 month and 3 month after bleomycin treatment in mice

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

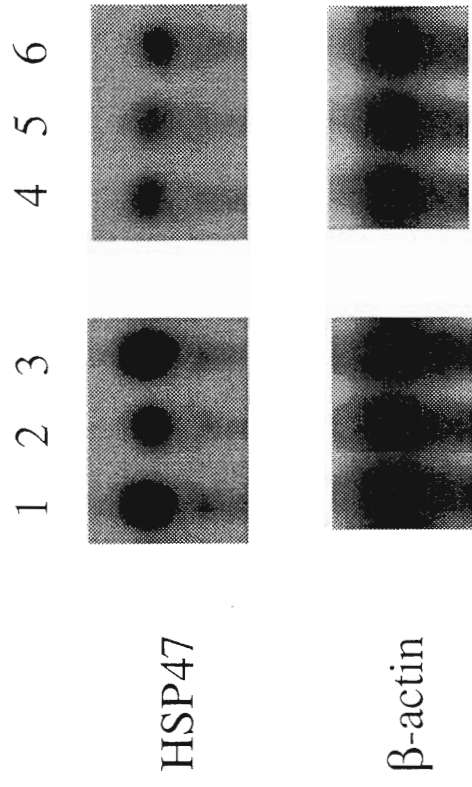


HSP47

β -actin

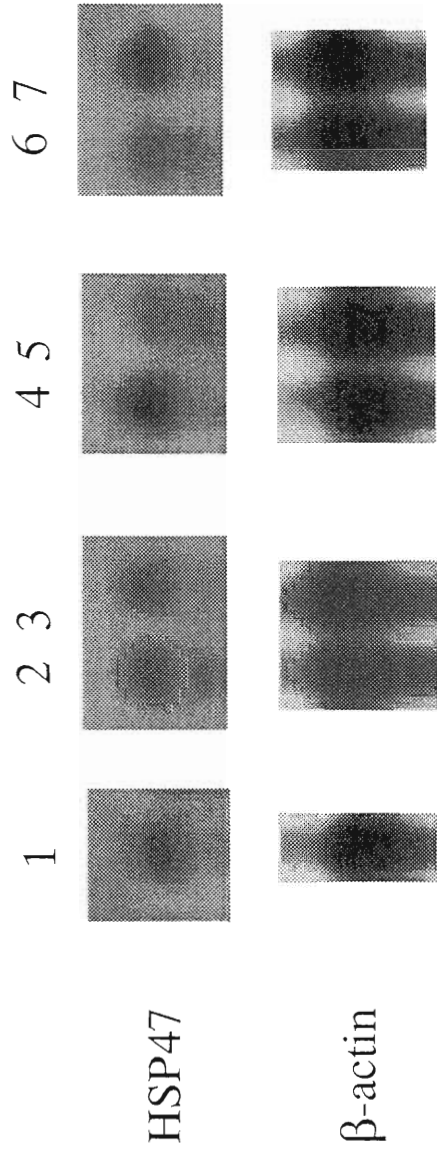
line 1-3: 4 day non-smoking, line 4-6: 4 day smoking, line 7-9: 1W non-smoking,
line 10-12: 1W smoking, line 13-15: 2W non-smoking, line 16-18: 2W smoking

Figure 6 Lung HSP47 gene expression at day 4, week 1 and 2 during cigarette smoke exposure in mice



line 1: 1M control, line 2 &3: 1M smoking,
 line 4 :2M control, line 5&6: 2M smoking

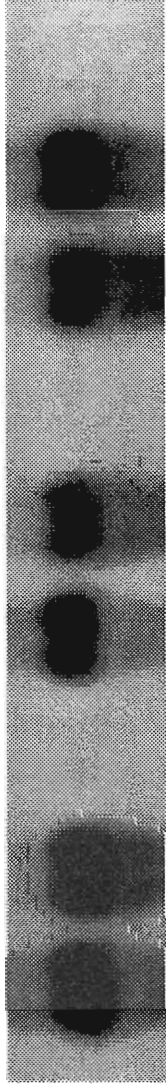
Figure 7 Lung HSP47 gene expression at month 1 and 2 during cigarette smoke exposure in mice



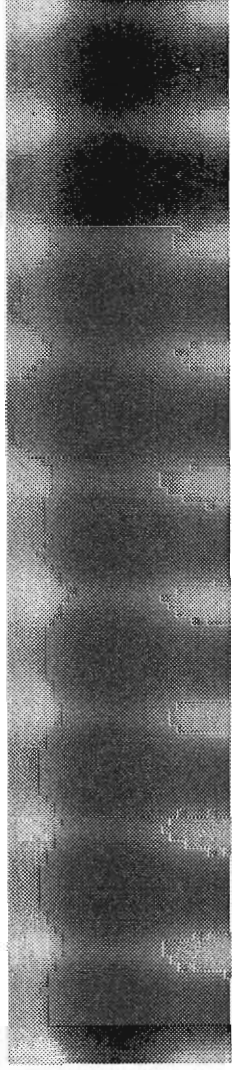
line 1: 3M control, line 2&3: 3M smoking,
 line4 &5: 6M control, line 6&7: 6M smoking

Figure 8 Lung HSP47 gene expression at month 3 and 6 during cigarette smoke exposure in mice

1 2 3 4 5 6 7 8 9



HSP47



β-actin

line 1, 4:2M Tg lung, line 2, 5:2M Tg heart, line 3, 6:2M Tg liver, line 7:2.5 M normal lung, line 8:2.5 M normal heart, line 9: 2.5 M normal liver

Figure 9 Comparison among liver, heart and lung on HSP47 gene expression in normal and Tg mice

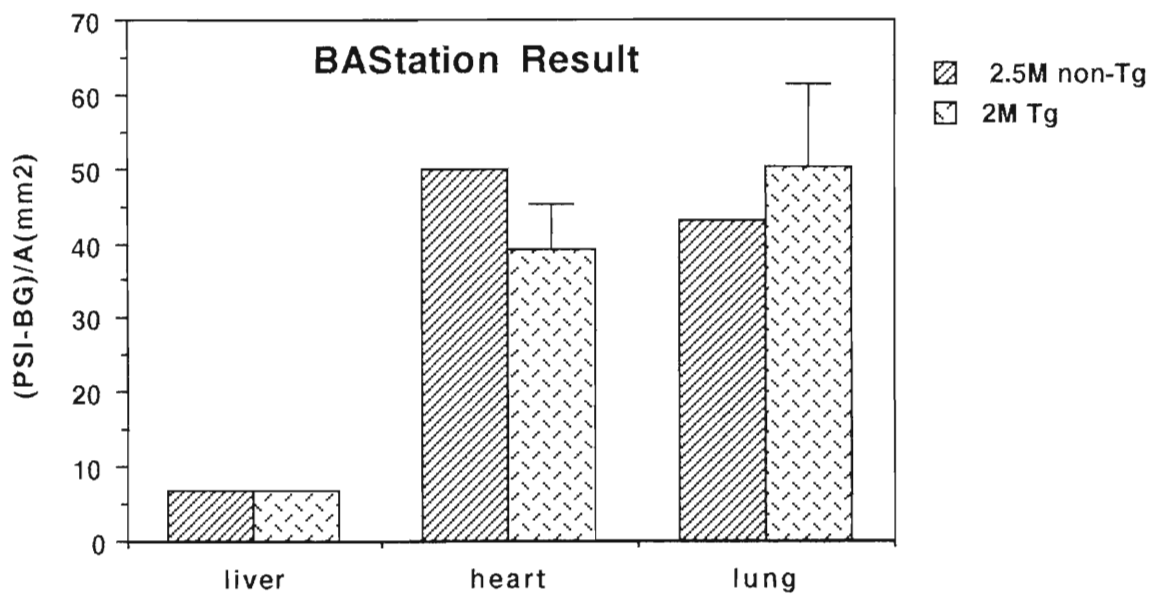


Figure 10 BAStation results of HSP47 gene expression in three organs of 2M Tg and 2.5M non-Tg mice

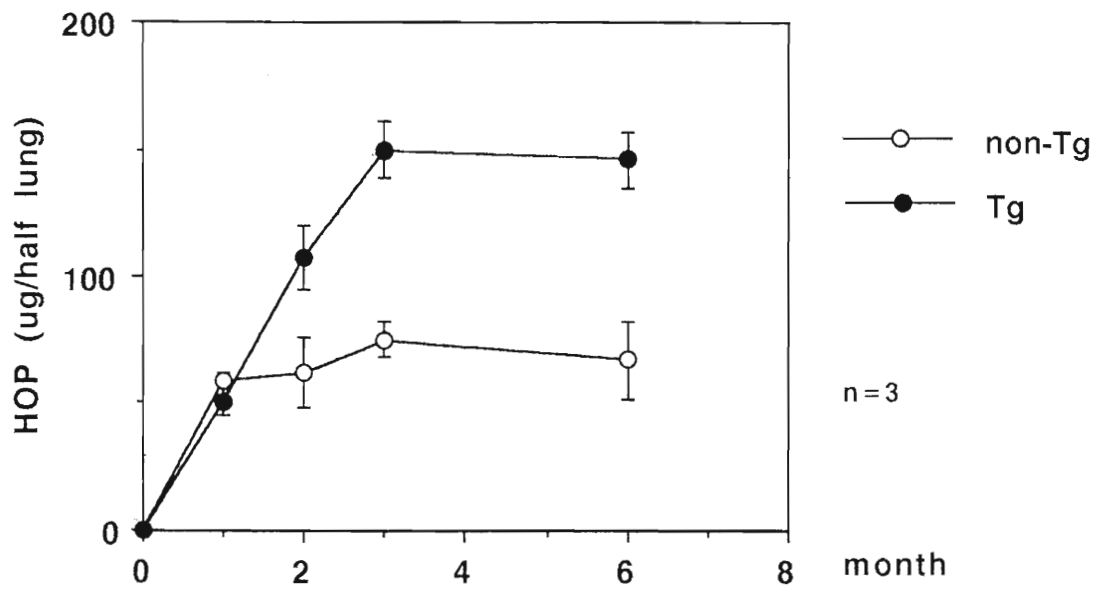


Figure 11 Chronological changes of lung hydroxyproline contents in Tg and non-Tg mice

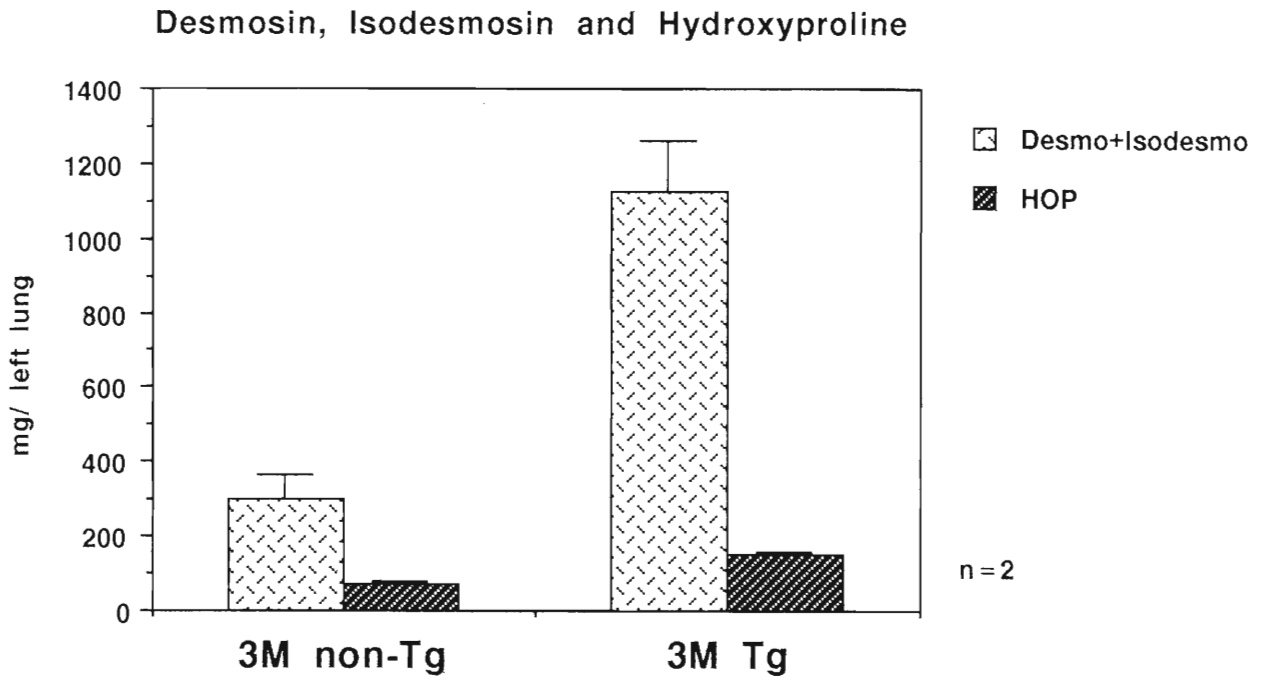


Figure 12 Lung collagen and elastin contents in 3M non-Tg and 3M Tg mice

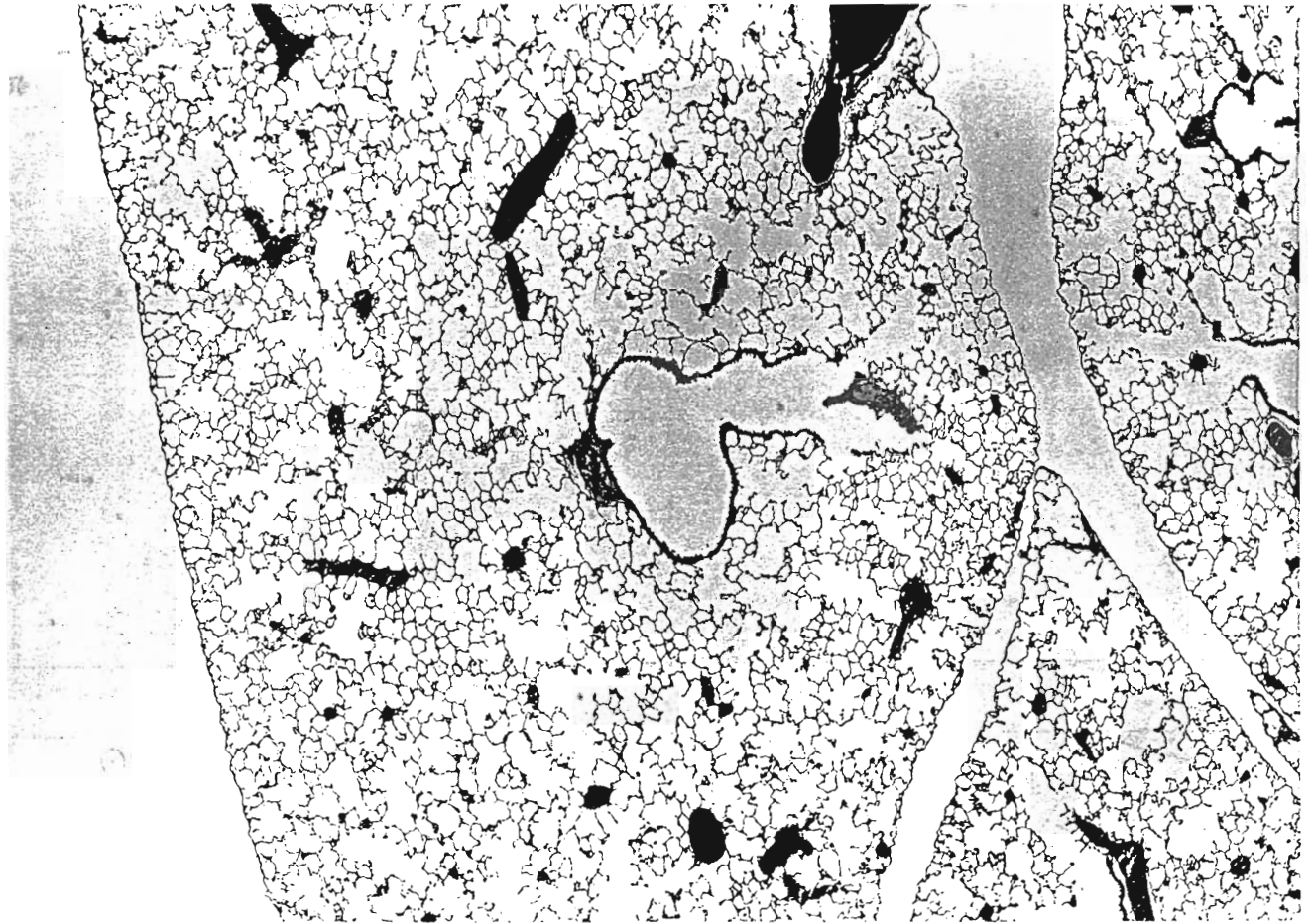


Figure 13 Photomicrographs (x 200) of the lung at 6 M non-Tg mouse

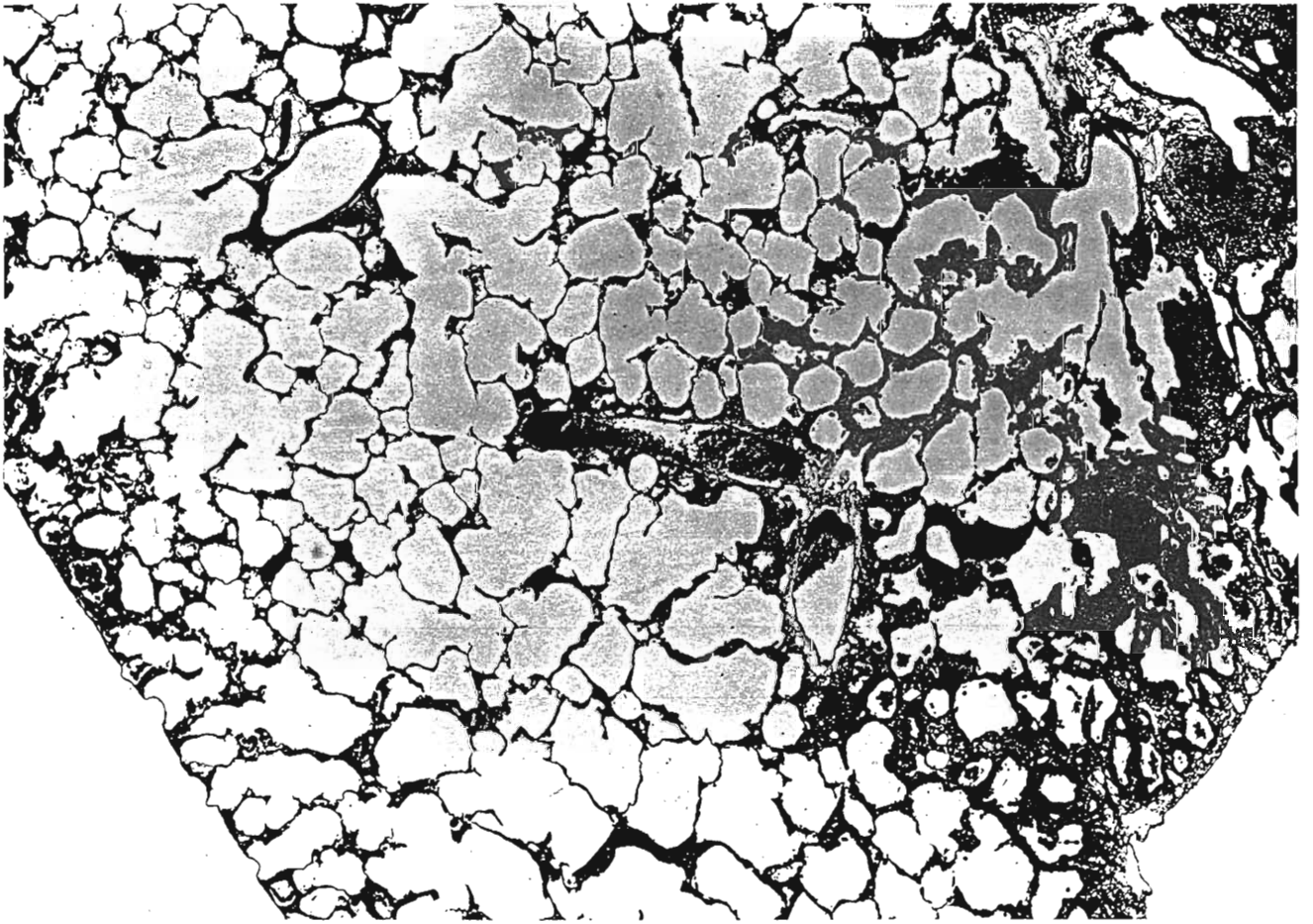


Figure 14 Photomicrographs (x 200) of the lung at 6 M Tg mouse

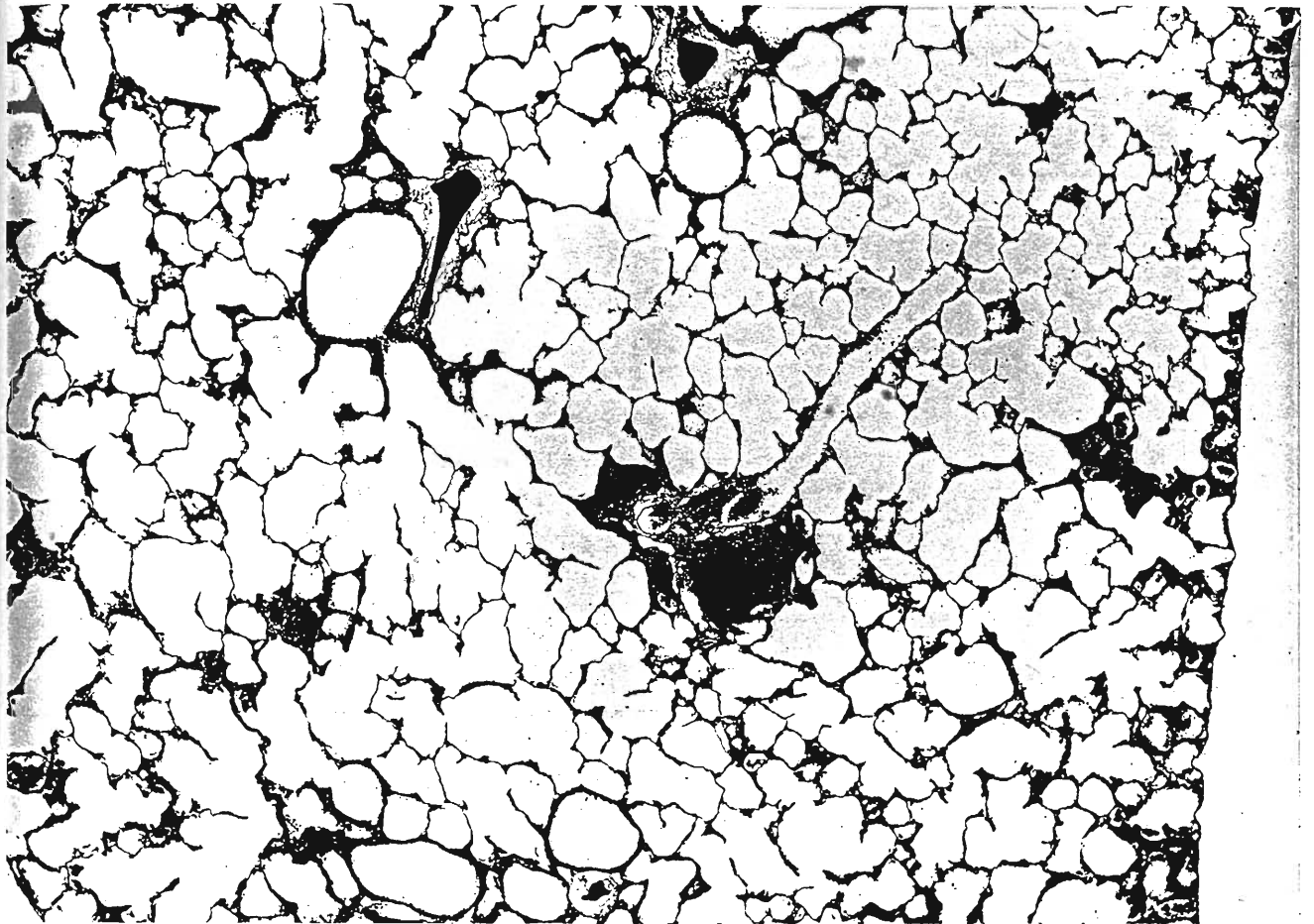


Figure 15 Photomicrographs (x 200) of the lung at 6 M. Tg mouse. Fibrotic lesion was observed in the lung



Figure 16 Photomicrographs (x 100) of the lung at 6 M. Tg mouse.

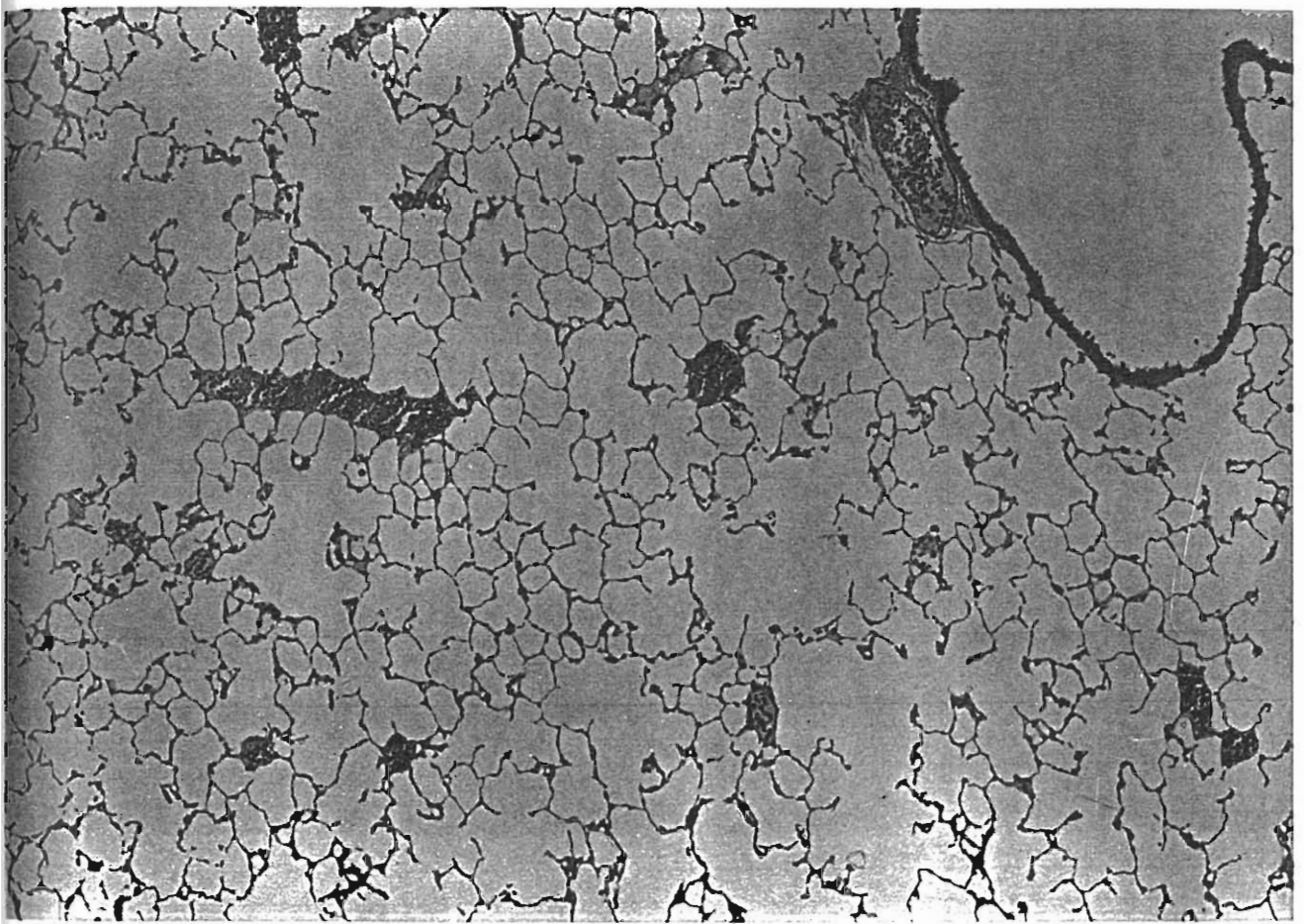


Figure 17 Photomicrographs (x 500) of the lung at 6 M. non-Tg mouse.

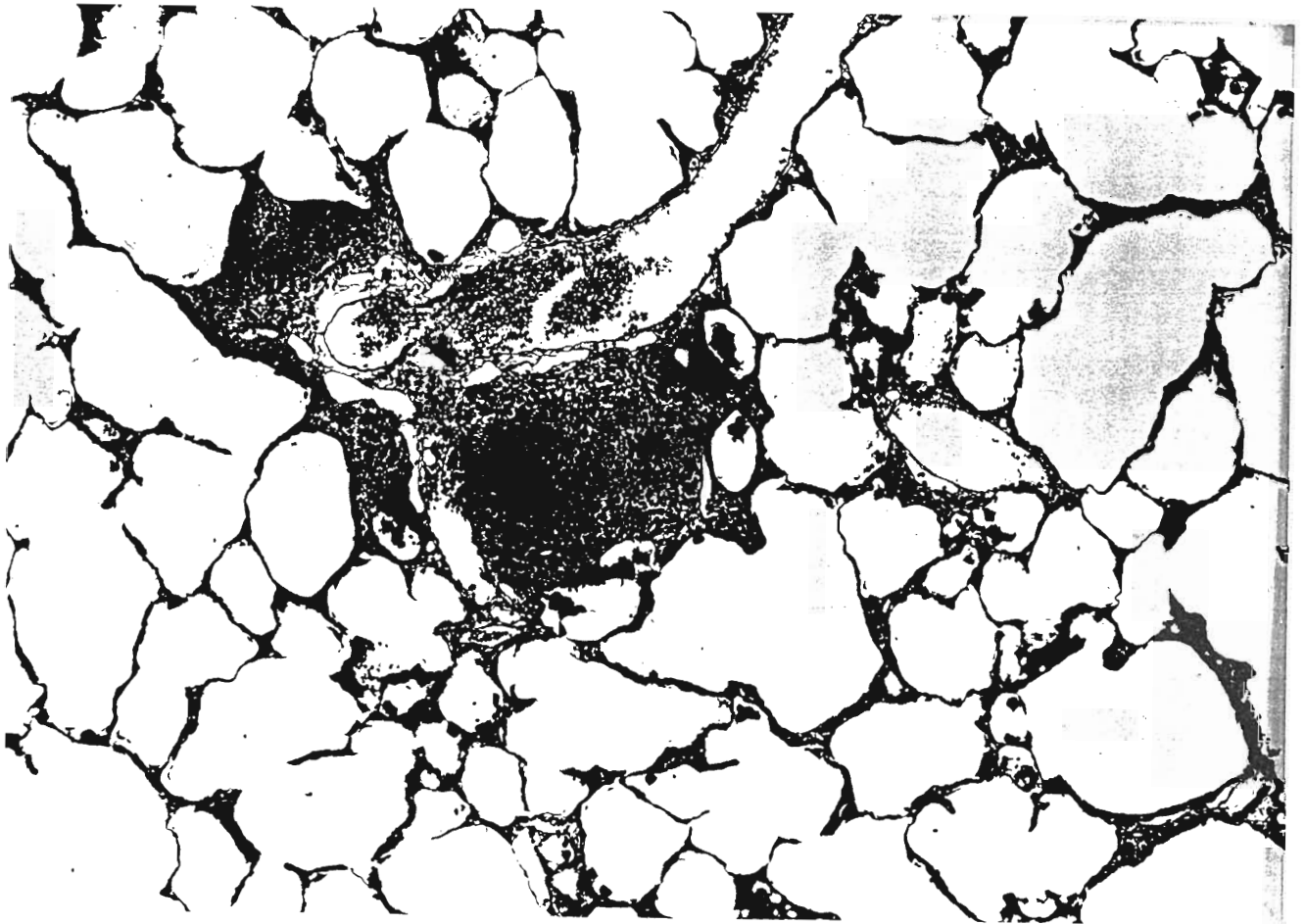


Figure 18 Photomicrographs (x 500) of the lung at 6 M. Tg mouse. Air spaces were enlarged and many inflammatory and immunocompetent cells were observed around of fibrotic lesion.

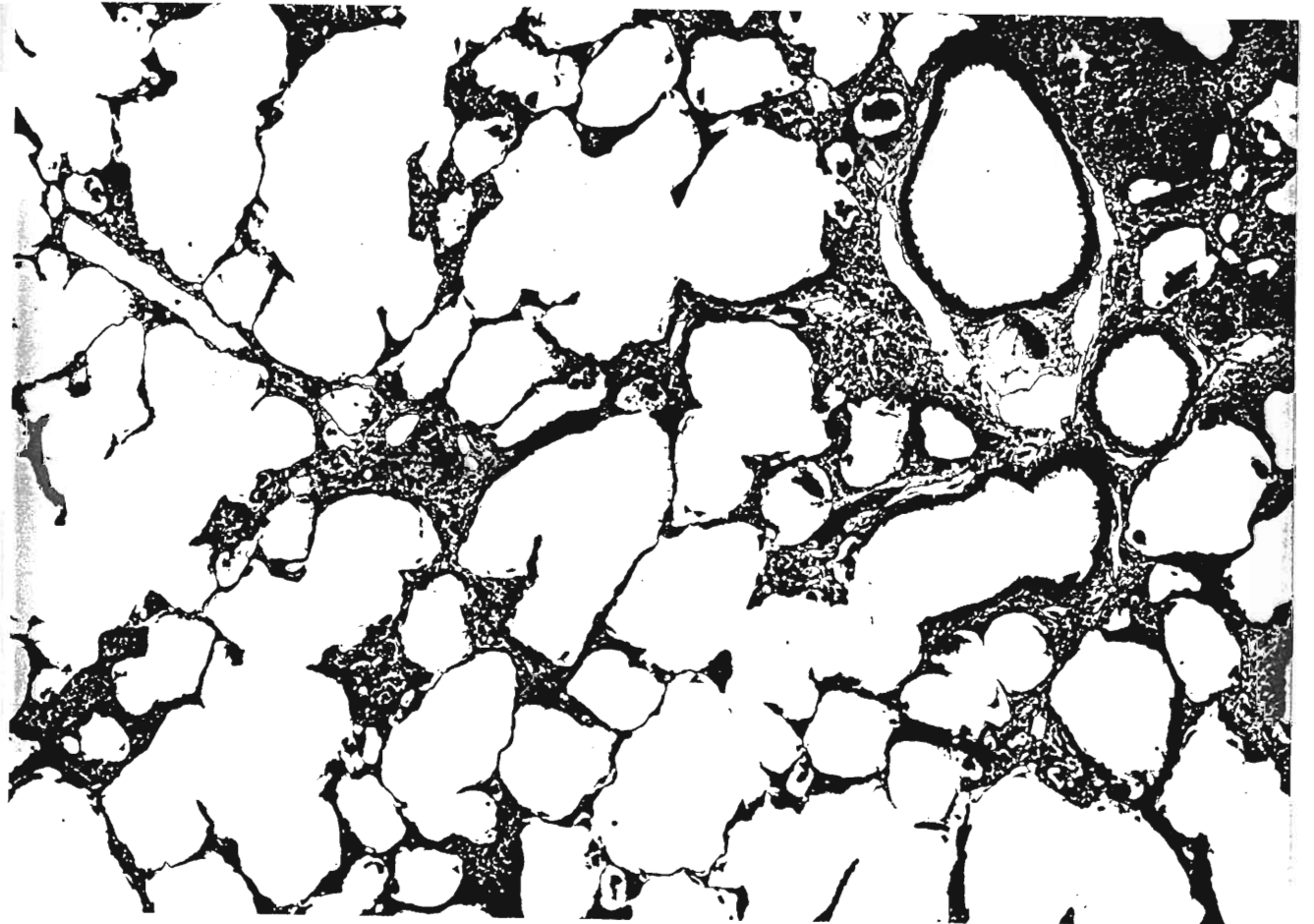


Figure 19 Photomicrographs (x 500) of the lung at 6 M. Tg mouse. Air spaces were enlarged and many inflammatory and immunocompetent cells were observed around of fibrotic lesion. Pulmonary architecture was destroyed.

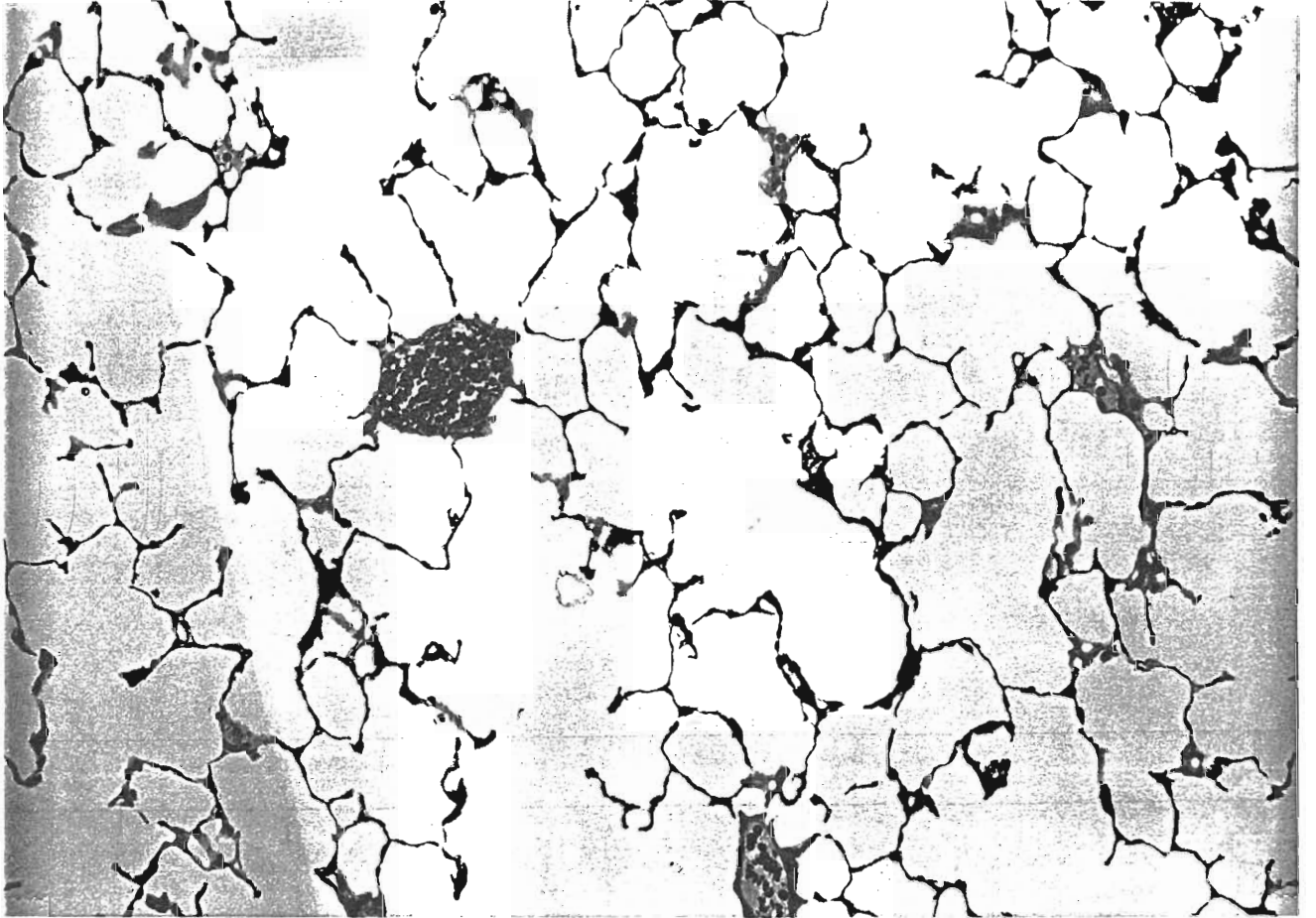


Figure 20 Photomicrographs (x 1000) of the lung at 6 M. non-Tg mouse.

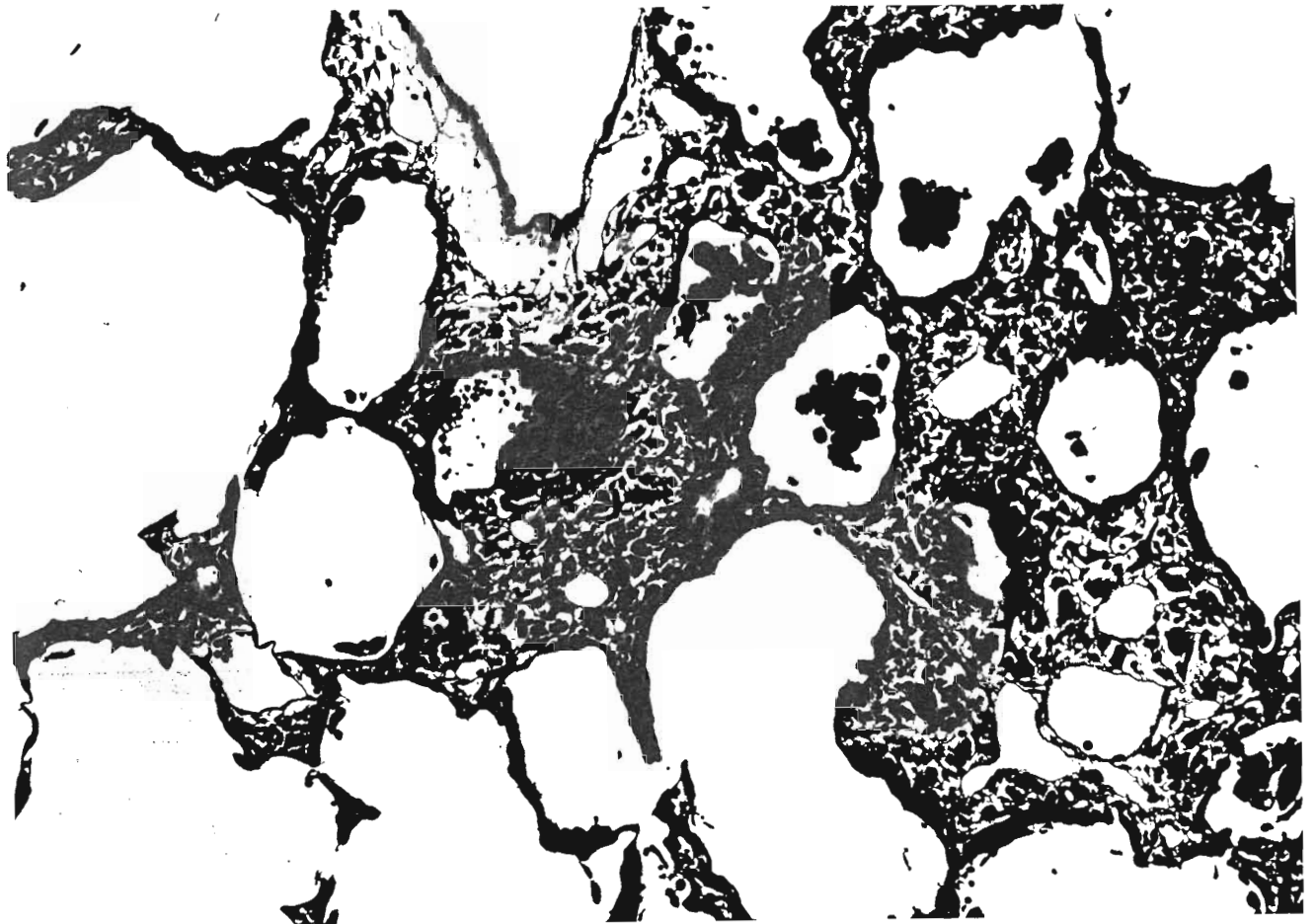
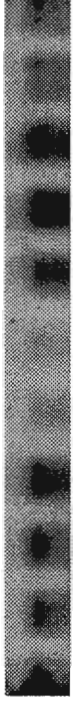


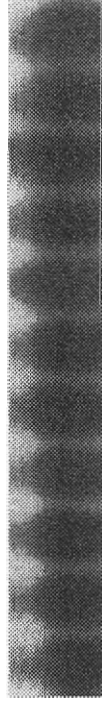
Figure 21 Photomicrographs (x 1000) of the lung at 6 M. Tg mouse.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

HSP47

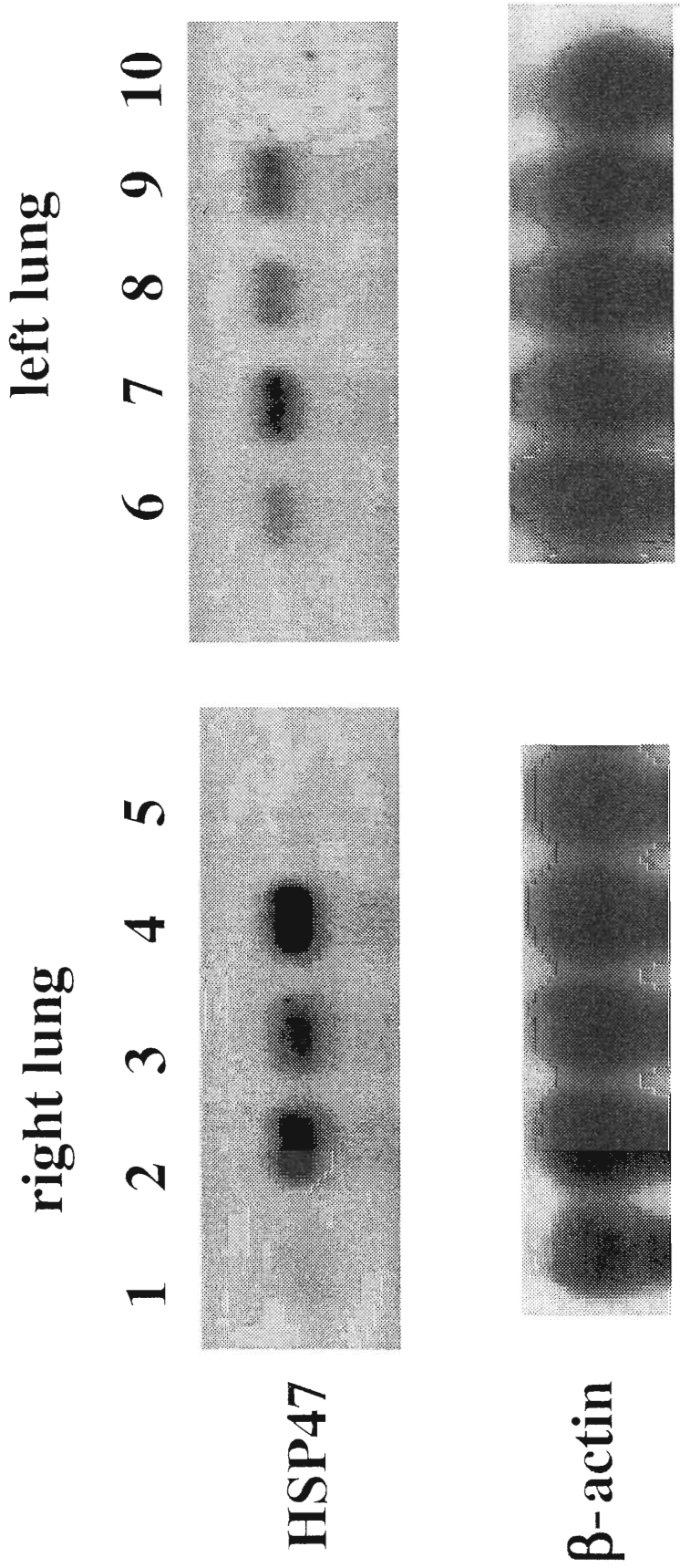


β -actin



line 1: 1M Tg, line 2: 2M Tg, line 3 : 3M Tg, line 4 : 4M Tg, line 5 : 5M Tg, line 6 : 10M Tg, line 7 : 1M non-Tg, line 8 : 2M non-Tg, line 9 : 3M non-Tg, line 10 : 4M non-Tg, line 11: 5M non-Tg

Figure 22 Chronological lung HSP47 gene expression in Tg and non-Tg mice



line 1,6:1Y Tg, line 2, 7:1Y normal, line 3, 8:1Y normal,
 line 4, 9:5M normal, line 5, 10: 5M Tg,

Figure 23 Comparison with HSP47 gene expression in both right and left lungs of Tg and non-Tg mice

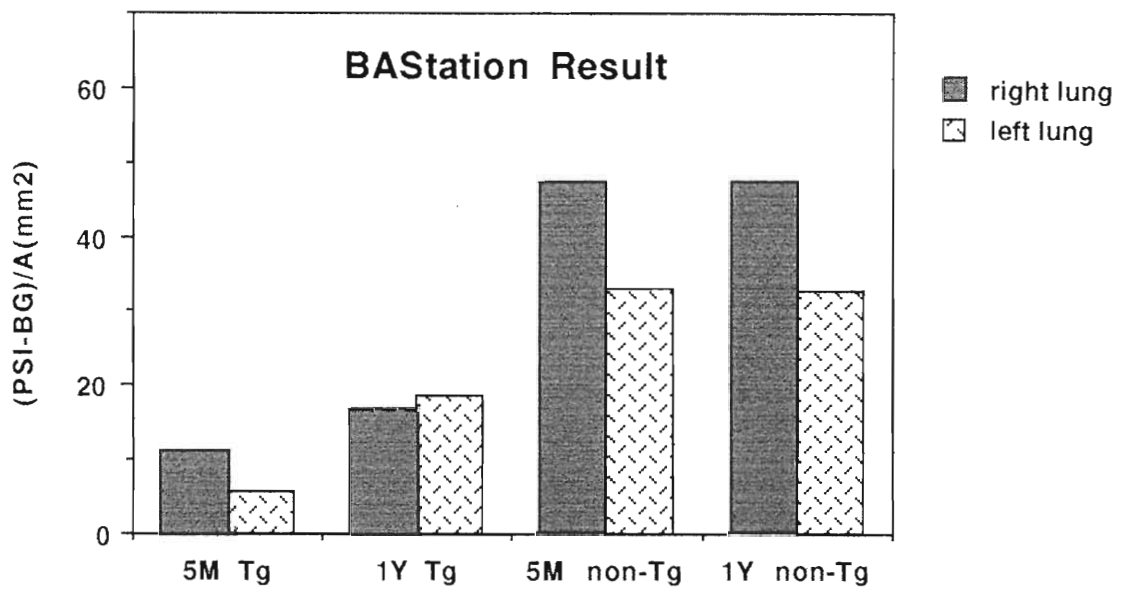


Figure 24 BAStation results of lung HSP47 gene expression in right and left lungs of Tg and non-Tg mice

Immunoblot

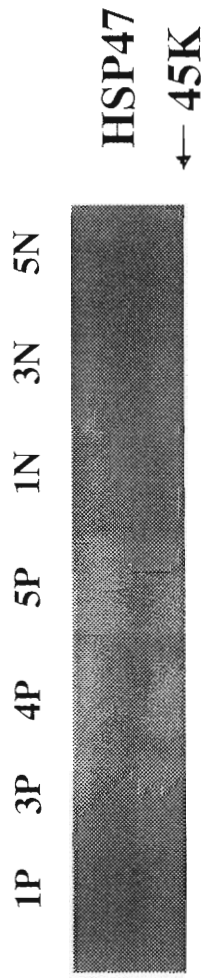


Figure 25 Results of Western blotting in Tg and non-Tg lung tissues

1P: Tg at 1 mo of age, 3P: Tg at 3 mo of age, 4P: Tg at 4 mo of age,
5P: Tg at 5 mo of age, 1N: non-Tg at 1 mo of age, 3N: non-Tg at 3
mo of age, 5N: non-Tg at 5 mo of age

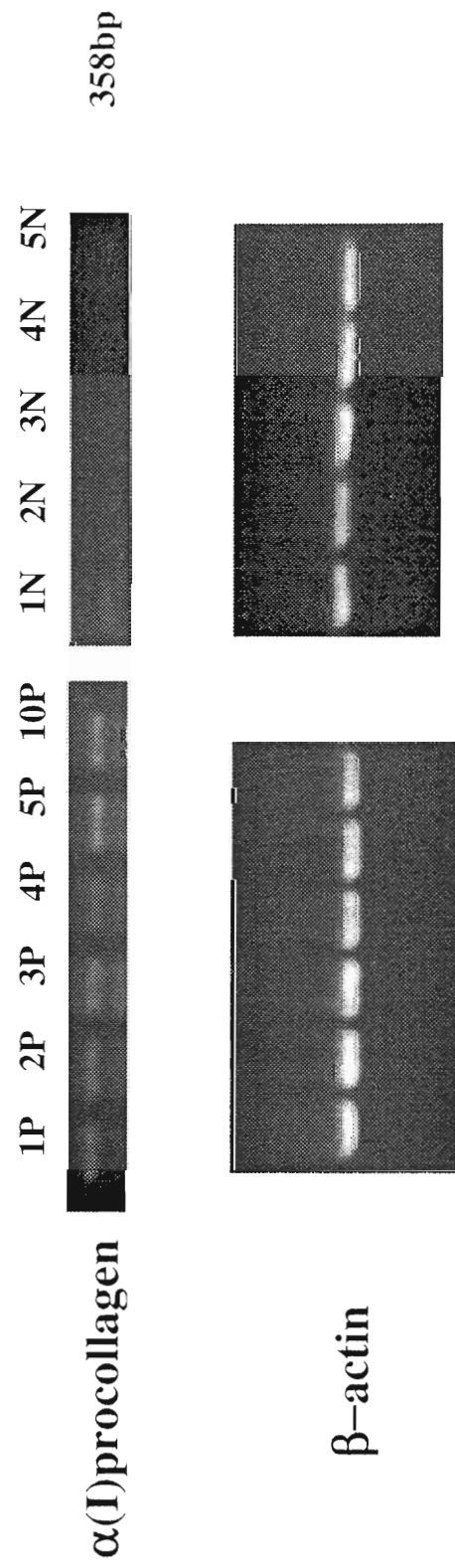


Figure 26 RT-PCR result of lung Collagen Type I mRNA and β -actin mRNA in Tg and non-Tg mice

1P: Tg at 1 mo of age, 2P: Tg at 2 mo of age, 3P: Tg at 3 mo of age, 4P: Tg at 4 mo of age, 5P: Tg at 5 mo of age, 10P: Tg at 10 mo of age, 1N: non-Tg at 1 mo of age, 2N: non-Tg at 2 mo of age, 3N: non-Tg at 3 mo of age, 4N: non-Tg at 4 mo of age, 5N: non-Tg at 5 mo of age

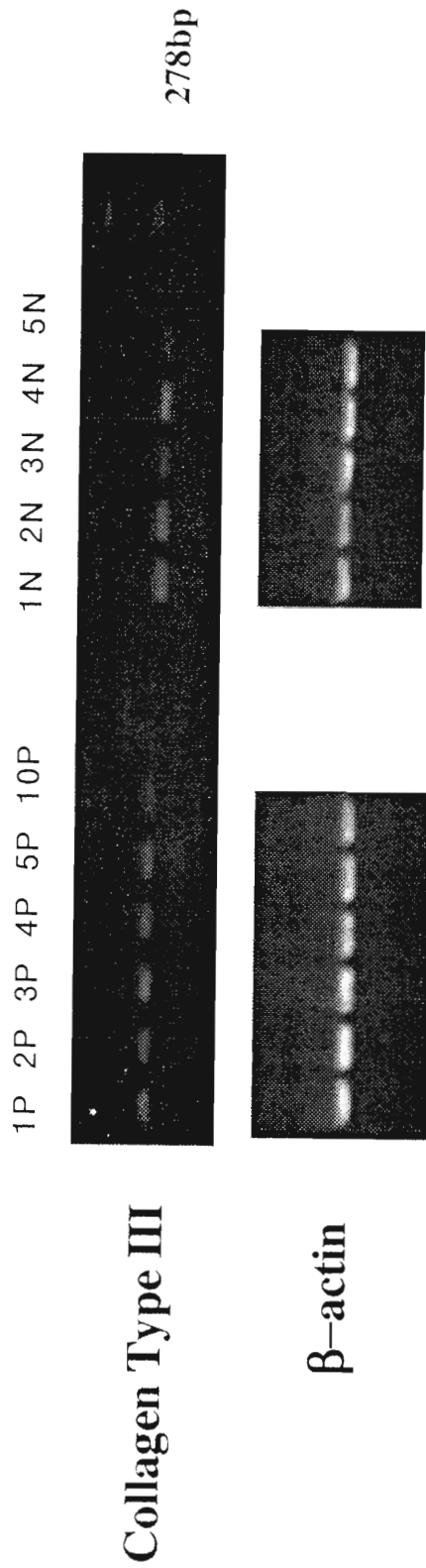


Figure 27 RT-PCR result of lung Collagen Type III mRNA and β -actin mRNA in Tg and non-Tg mice

1P: Tg at 1 mo of age, 2P: Tg at 2 mo of age, 3P: Tg at 3 mo of age, 4P: Tg at 4 mo of age, 5P: Tg at 5 mo of age, 10P: Tg at 10 mo of age, 1N: non-Tg at 1 mo of age, 2N: non-Tg at 2 mo of age, 3N: non-Tg at 3 mo of age, 4N: non-Tg at 4 mo of age, 5N: non-Tg at 5 mo of age

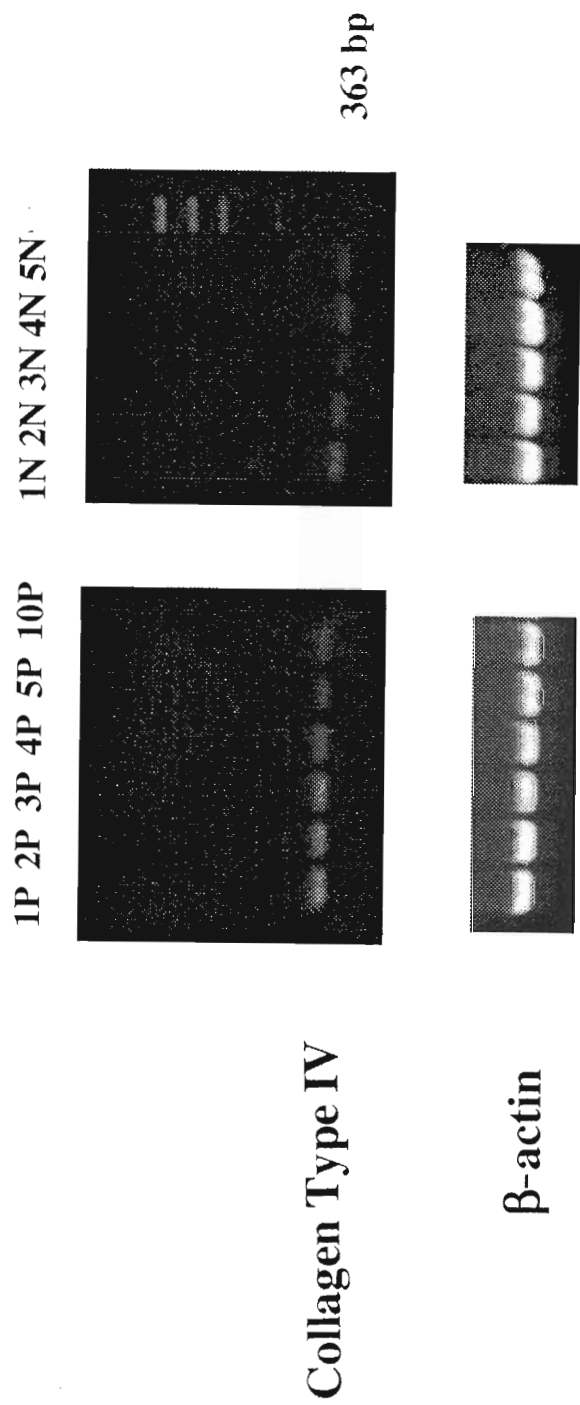


Figure 28 RT-PCR result of lung Collagen Type IV mRNA and β-actin mRNA in Tg and non-Tg mice

1P: Tg at 1 mo of age, 2P: Tg at 2 mo of age, 3P: Tg at 3 mo of age, 4P: Tg at 4 mo of age, 5P: Tg at 5 mo of age, 10P: Tg at 10 mo of age, 1N: non-Tg at 1 mo of age, 2N: non-Tg at 2 mo of age, 3N: non-Tg at 3 mo of age, 4N: non-Tg at 4 mo of age, 5N: non-Tg at 5 mo of age

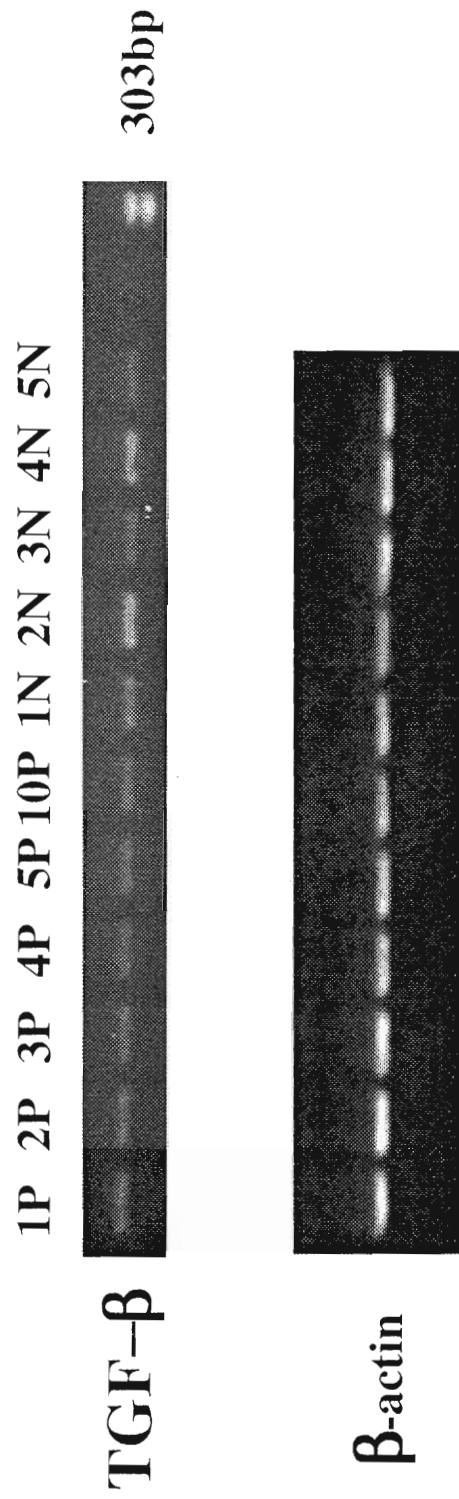


Figure 29 RT-PCR result of lung TGF- β mRNA and β -actin mRNA in Tg and non-Tg mice

1P: Tg at 1 mo of age, 2P: Tg at 2 mo of age, 3P: Tg at 3 mo of age, 4P: Tg at 4 mo of age, 5P: Tg at 5 mo of age, 10P: Tg at 10 mo of age, 1N: non-Tg at 1 mo of age, 2N: non-Tg at 2 mo of age, 3N: non-Tg at 3 mo of age, 4N: non-Tg at 4 mo of age, 5N: non-Tg at 5 mo of age

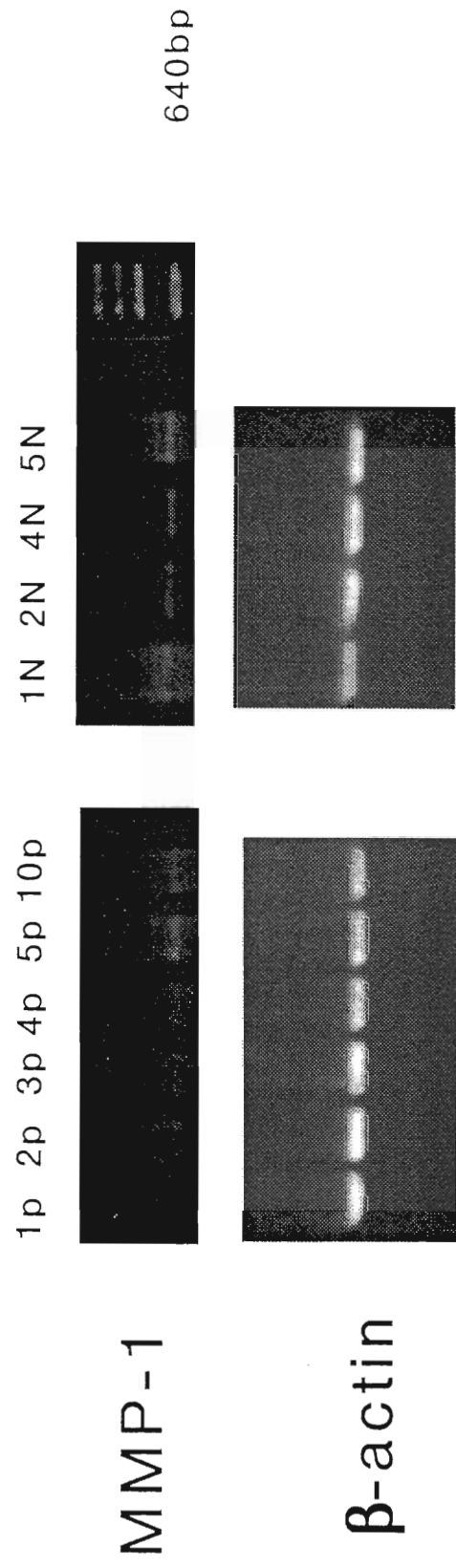


Figure 30 RT-PCR result of lung MMP-1 mRNA and β -actin mRNA in Tg and non-Tg mice

1P: Tg at 1 mo of age, 2P: Tg at 2 mo of age, 3P: Tg at 3 mo of age, 4P: Tg at 4 mo of age, 5P: Tg at 5 mo of age, 10P: Tg at 10 mo of age, 1N: non-Tg at 1 mo of age, 2N: non-Tg at 2 mo of age, 4N: non-Tg at 4 mo of age, 5N: non-Tg at 5 mo of age

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

Gene	Primer Sequence	product (bp)
collagen type I	sense 5'-CAAGAARGGCGACCGTGGTGA-3'	358
	antisense 5'-GGTGTGACTCGTGCAGCCATC-3'	
collagen type III	sense 5'-TATGTGTCTGTGACTCAGGA-3'	260
	antisense 5'-AGGTCACCATTTCTCCCAG-3'	
collagen type IV	sense 5'-GTGCGGTTGTGAAGCACCCG-3'	363
	antisense 5'-GTTCTTCTCATGCACACTT-3'	
TGF-beta	sense 5'-AGGAGACGGAAATACAGGGCTTTTCG-3'	303
	antisense 5'-ATCCACTTCCAAACCCAGGTCCCTTC-3'	
MMP-1	sense 5'-TTGTTGCTGCCCCATGAGCTT-3'	640
	antisense 5'-ACTTTGTGCGCCAAATCCAGG-3'	
beta-actin	sense 5'-ACCGTGAAGATGACCCAG-3'	528
	antisense 5'-TACGGTGTCAACGTCACAC-3'	

**Tabel 2 Results of ventilatory parameters of the Tg and non-Tg mice
using whole-body plethysmograph**

	n	VE (ml/min/g)	VT(ml/g)	respiratory rate	VT/Ti
2.5M normal	2	2.8±0.2	0.2±0	270±9	2.7±0.1
2.5M Tg	2	3.2±1.0	0.18±0.07	334±6	2.6±1.0
12M normal	3	2.7±0.3	0.3±0.01	278±7	3.2±0.2
12M Tg	2	4.2±0.6	0.31±0.08	389±20	4.3±1.0