

Review

肺線維症とアポトーシス

桑野和善, 萩本直樹, 原 信之

九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設

Pulmonary Fibrosis and Apoptosis

Kazuyoshi KUWANO, Naoki HAGIMOTO and Nobuyuki HARA

Research Institute for Diseases of the Chest, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Received, 30 November 2001; accepted, 5 March 2002.

Abstract: Apoptosis plays important roles in organ development, cell differentiation, and the maintenance of homeostasis. Recently, increasing attention has been paid to the importance of epithelial cell death during the process of pulmonary fibrosis. Apoptosis of infiltrating leukocytes and parenchymal cells is also thought to participate in the resolution of acute inflammation and tissue remodeling. Various inflammatory mediators and death factors induce epithelial cell damage and apoptosis in pulmonary fibrosis. To protect epithelial cells from apoptosis and maintain their function may be an effective therapy against pulmonary fibrosis. A clarification of the regulatory mechanism of death-signaling molecules could lead to the development of novel strategies against pulmonary fibrosis.

Key words: pulmonary fibrosis, lung injury, apoptosis, epithelium

はじめに

細胞死はその形態学的特徴から、アポトーシスとネクローシスに大別される。アポトーシスは、本来、発生分化の段階で認められる programmed cell death の形態変化であり、ネクローシスは薬剤、毒物、紫外線などの外的刺激によって起こるとされていた。すなわち、プログラムされた細胞死は、細胞や核の凝縮、断片化と共に、染色体 DNA の断片化を伴うアポトーシスと呼ばれる過程を経て死滅する。これに対して、物理化学的要因によって引き起こされる不慮の死は細胞や核が膨潤し破裂するネクローシスの過程を経て死ぬと考えられていた。しかし最近では、後者のような細胞外部からの刺激、たとえば抗癌剤や放射線による細胞死、毒素やウイルス感染による細胞死や、細胞傷害性リンパ球による標

的細胞死などでもアポトーシスの形態をとることが知られるようになり、アポトーシスはプログラムされた細胞死を含む広義の細胞死と考えられている。

アポトーシスは細胞の増殖・分化、器官の発達・分化に不可欠であり、ホメオスタシスの維持に重要な働きをしている。従って、アポトーシスが過剰でも不十分でも疾患の原因となりうる。アポトーシスの分子機構が明らかになるにつれて、疾病を組織や細胞におけるアポトーシス誘導の異常としてとらえ、この面からの研究が盛んに行われている。自己免疫疾患、膠原病、肝疾患、腎疾患、心疾患などあらゆる臓器の疾病において、炎症と組織の損傷およびリモデリングの過程におけるアポトーシスの重要性が報告されている。

アポトーシスは、肺疾患においても重要であり、その機構の破綻は疾病につながる。アポトーシスの役割の一つは、炎症細胞をはじめとする不必要になった細胞を、有害な代謝産物を細胞外に放出させることなく消滅させることである。この機構が破綻すれば、炎症が遷延することになる。実際に、急性肺損傷の正常な修復には、集簇した炎症細胞や、増殖した線維芽細胞がアポトーシスによって、肺胞壁や肺胞腔から除去されることの重要性が報告されている¹⁾。また、逆にアポトーシスが過剰であることが疾病につながることもある。たとえば、急性

別刷請求先: 桑野和善 〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設

Reprint requests to: Kazuyoshi Kuwano, Research Institute for Diseases of the Chest, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. Tel: +81-92-642-5378, Fax: +81-92-642-5389, e-mail: kkuwano@kokyu.med.kyushu-u.ac.jp

肺損傷である急性呼吸促迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS)²⁾ や、びまん性肺障害 (diffuse alveolar damage; DAD)³⁾、特発性間質性肺炎・肺線維症 (idiopathic interstitial pneumonia; IIP)⁴⁾ においては、肺上皮細胞の過剰なアポトーシスが病態と関連していることが報告されている。

肺損傷においては、その予後を規定する重要な因子は、肺上皮細胞や血管内皮細胞の正常な機能の維持と、線維化の抑制と考えられる。肺損傷の際には、tumor necrosis factor (TNF) や Fas リガンド (FasL) などの death-receptor を介するアポトーシスの誘導因子をはじめとして、death-receptor に依存せずミトコンドリアを介してアポトーシスに関与する活性酸素、一酸化窒素、炎症性サイトカイン、ケモカインなど多くの因子が、肺上皮細胞や血管内皮細胞の損傷に関与していると考えられる。肺の線維化は、肺胞壁の傷害に始まり、その修復の過程において、上皮細胞、炎症細胞、および間葉細胞の均衡が破綻することによって、正常な修復が妨げられた結果と考えられる。上皮傷害の程度が正常な修復能を凌駕するようであれば基底膜が断裂し、リモデリ

ングの結果、非可逆的な線維化に至り、肺機能の低下と予後不良につながる (Fig. 1)。すなわち、外界とのバリア役の主役を演じる肺上皮細胞の cell loss とその他の線維芽細胞に代表される間葉系細胞の増殖とのバランスが非常に重要であり、アポトーシスはこれらの細胞の数調節にとって必須機構である。ARDS や IIP の急性型ないし急性増悪期が依然として治療に抵抗性で予後不良である理由は、様々な因子がアポトーシスを誘導しているにもかかわらず、治療法がステロイドを代表とする抗炎症に偏り、肺上皮細胞や、アポトーシスに対処していない可能性が考えられる。従って、アポトーシスの機構の理解に基づく治療法を開発することが、難治性の肺疾患の治療に役立つと考えられる。本稿では、肺上皮細胞のアポトーシスの機序を Fas 抗原 (Fas) や TNF receptor type 1 (TNFR 1) を代表とする death-receptor に依存する経路と、death-receptor に非依存性のミトコンドリアを介する経路の大きく2つに分けて、肺上皮細胞傷害・肺線維症におけるアポトーシスの役割について解説する (Fig. 2)。

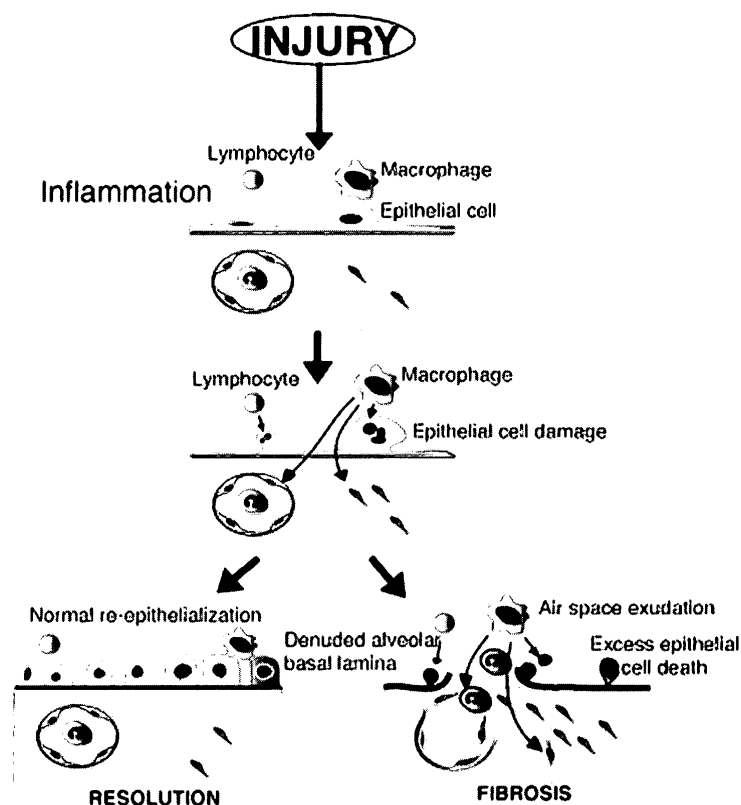


Fig. 1. The epithelial cell death in the pathogenesis of pulmonary fibrosis.

The alveolitis is initial event in pulmonary fibrosis. The process of pulmonary fibrosis develops from inflammatory cell infiltration and interstitial edema, to destruction of basement membrane, and to fibroblast proliferation and collagen deposition. When the tissue damage is mild, the injured tissue is usually repaired normally. However, when the epithelial cell damage and the basement membrane destruction are too severe to be repaired, the migration of fibroblasts into alveolar space leads to irreversible intraalveolar fibrosis as well as interstitial fibrosis.

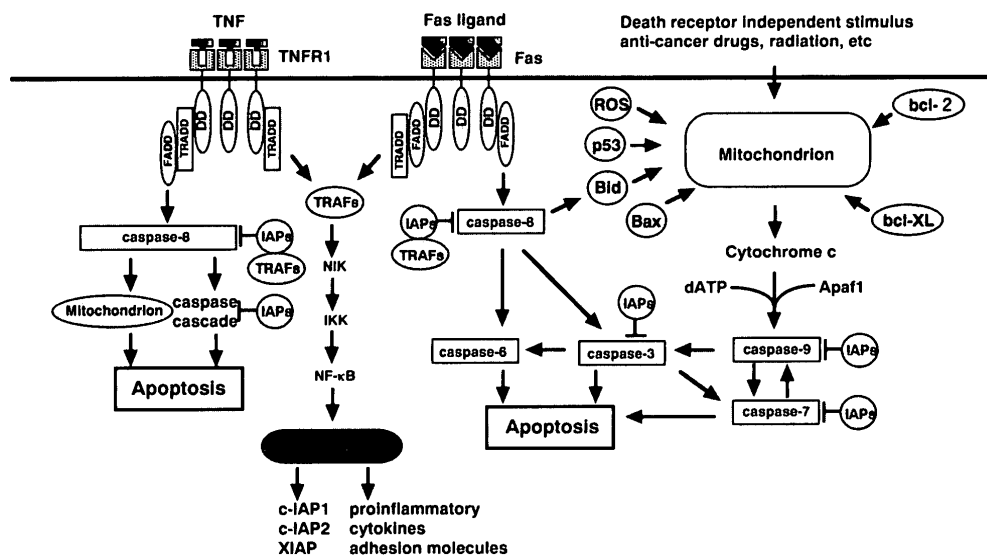


Fig. 2. Death receptor dependent and independent cell death pathway.

There are two principle signaling pathways of apoptosis, one is death receptor-dependent pathway and another pathway, which triggered by many stimuli such as reactive oxygen radicals, anti-cancer drugs, radiation, and growth factor deprivation, is initiated in mitochondrion. Activation of death receptors results in the recruitment of adaptor proteins through interaction of death domain. Recruitment of FADD to Fas or to TNFR1 through TRADD activates initiator caspase-8. Cytochrome c is released into the cytosol from mitochondria and binds to Apaf1 with ATP, which resulting in the activation of caspase-9. The activation of caspase-8 or caspase-9 leads to the activation of caspase cascade and apoptosis. NF- κ B signal transduction pathway is also initiated through the interaction of TRADD and TRAFs. The activated NF- κ B promotes the transcription of IAPs as well as proinflammatory cytokines. IAPs inhibit apoptosis through blocking caspase-3, caspase-7, and caspase-9 directly, and also inhibit caspase-8 along with TRAFs. The apoptosis signaling is variable, and depends on the type of cells.

肺損傷・肺線維化における death-receptor を介する 肺上皮細胞のアポトーシス

1. The Fas-FasL pathway

近年アポトーシスの分子生物学的解明が進み、なかでも細胞をアポトーシスに導く Fas-FasL pathway が注目されている。Fas は TNF 受容体ファミリーに属する I 型膜蛋白質であり、様々な臓器の細胞に発現する⁵⁾。Fas や TNFR1 の細胞質領域には、アポトーシスのシグナル伝達に必要な“death domain”と呼ばれる相同性を示す領域が存在する。FasL は TNF ファミリーの一員であり、このファミリーには TNF, FasL をはじめ、TNF 受容体ファミリーに属する CD 40, CD 27, CD 30 などに対するリガンドが属している⁶⁾。FasL がその受容体である Fas に結合すると細胞内ではカスパーゼをはじめとするプロテアーゼが活性化し、アポトーシスを誘導する。Fas-FasL pathway の働きは多岐にわたる (Fig. 3)。まず第 1 に、Fas-FasL pathway は免疫反応を終息させる役割をもつ。すなわち、抗原提示細胞との相互作用により活性化された T リンパ球は

FasL を発現し、隣接する T リンパ球上の Fas に作用し免疫反応を終息させると考えられる。Fas-FasL pathway に異常がある場合、たとえば、Fas, FasL 遺伝子の機能不全を呈する lpr, gld マウスにおいては、活性化され死ぬべき T 細胞が死滅できず蓄積する。第 2 に、FasL は、種々の cytotoxic T lymphocytes (CTL) 細胞株や、活性化された T 細胞、NK 細胞で発現されている。ウイルスに感染した細胞や、癌細胞は、その抗原を MHC の複合体として提示する。これを介して T 細胞は活性化され、NK 細胞と共に FasL をエフェクター分子として、Fas に作用し細胞を死滅させる。第 3 に、免疫隔離組織である精巣や眼の間質細胞や、ある種の癌細胞は、FasL を構成的に発現し、これらの細胞に近寄ってくる免疫細胞を死滅させる。大腸癌、メラノーマ、肝癌、肺癌、といった腫瘍でも FasL の発現が認められ、同様の機序によって免疫反応を回避している可能性がある。

以上のように、Fas-FasL pathway は炎症の終息だけでなく、細胞性免疫や組織傷害に関連していることから、肺損傷と肺の線維化においても重要であると考えられる。実際に、IIP や膠原病に伴う肺線維症 (CVD-

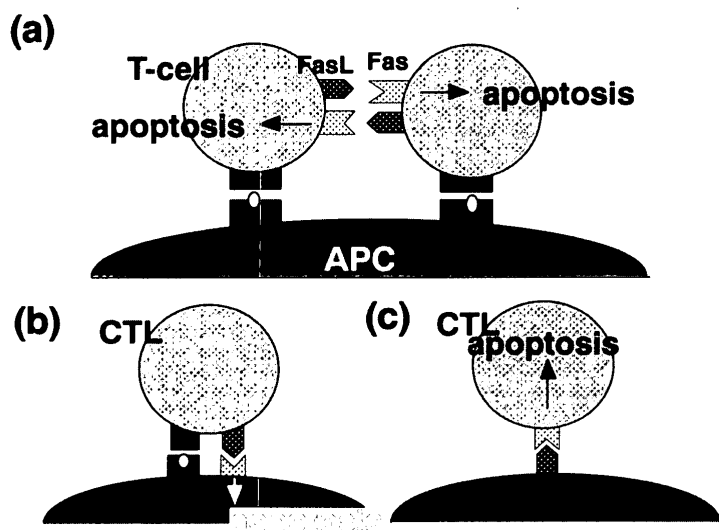


Fig. 3. The roles of Fas-Fas ligand pathway.

(a) The Fas-Fas ligand pathway is involved in the activation-induced suicide of T cells. When mature T cells encounter target cells, they are activated and proliferate. After the activated T cells accomplished their task, they must be removed to avoid accumulation. (b) Activation of cytotoxic T lymphocytes through T cell receptor activation with viral antigens induces the expression of the Fas ligand gene. The Fas ligand expression of the surface of the effector cells binds to Fas on the target cells and causes apoptosis. (c) When inflammatory cells enter immune privilege sites such as the eyes or the testis, they are immediately killed by Fas ligand expressed in these organs. Fas ligand expressed on tumor cells counter attacks cytotoxic T cells and natural killer cells by binding Fas on their surface to cause apoptosis.

IP)の肺組織においては、細気管支上皮、肺胞上皮細胞には、Fasの発現が正常肺に比較して増強し、気管支肺胞洗浄液中、および組織に浸潤するリンパ球には、FasLの発現が認められ、正常肺組織と比較し、有意に増強している⁷⁾。リンパ球より発現されるFasLが、肺上皮細胞にアポトーシスを誘導すると考えられる。実際に、Gavrieliら⁸⁾によって確立されたTUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling)法を用いると、DNA切断端を組織上で染色することによってDNA傷害やアポトーシスを肺上皮細胞に検出できる。これに対し、炎症細胞はTUNEL陰性であり、このことは、FasLによって、炎症細胞にはアポトーシスは誘導されておらず、むしろ炎症細胞を活性化し、炎症を増悪する因子として働いている可能性が示唆される。また、IIP、膠原病肺、過敏性肺臓炎患者のBAL中の可溶性FasLが高値を示し、リンパ球性胞隔炎の程度をよく反映することや、Bronchiolitis Obliterans Organizing Pneumonia (BOOP)のBALF中で可溶性Fasが高値を示すこと⁹⁾は、Fas-Fas ligand pathwayが肺損傷における胞隔炎において重要であることを示唆している。

Matute-BelloらはARDSの患者気管支肺胞洗浄液

(BALF)中に可溶性FasLが存在し、そのBALFはFas経路を介して培養細気管支上皮細胞をアポトーシスに誘導することを報告した¹⁰⁾。彼らはBALF中の可溶性Fas ligandの濃度はARDSの予後と関連すること、またARDS患者のBALF中にはFas経路を増強する何らかの因子が含まれていることを示唆した。またマウスに直接アポトーシス誘導性の抗Fas抗体、リコンビナントFasLを経気管的に投与した場合、肺上皮細胞はアポトーシスに誘導され、同時にARDS類似の肺出血、浮腫、好中球を主体とした胞隔炎が誘導された^{10),11)}。実際に、Fas刺激による細胞の反応は、必ずしもアポトーシスとは限らず、FasLは好中球に対して走化性、活性化能を有する可能性があること¹²⁾や、人末梢血T細胞にも活性化、増殖を誘導しうること¹³⁾が報告されている。

Fas ligationによって細胞内シグナルは、カスパーゼを活性化しアポトーシスに至る経路だけでなく、NF κ Bを活性化する経路が知られている。たとえば、大腸癌細胞はFas ligationによって、IL-8を産生する。我々も、ヒトの細気管支上皮細胞は、Fas ligationによって、アポトーシスに誘導されるが、NF- κ Bを介してproinflammatory cytokineであるIL-8を産生することを報告した¹⁴⁾。このことは、Fas ligationが肺組織を構成する細胞によって異なる反応をする可能性があり、肺損傷や、肺線維症の病態との関連において重要であると思われる。ある環境下においては、肺上皮傷害(アポトーシス)が好中球遊走、活性化に先行して起こっている可能性が考えられ、胞隔炎を制御するこれまでのARDSやIIPの治療が必ずしも有効ではないことを考慮すると、非常に興味深い。

マウスのLPS惹起急性肺傷害モデルにおいては、肺上皮細胞、血管内皮細胞にアポトーシスが誘導され、Fasの下流で働くカスパーゼ阻害剤投与にてこれらのアポトーシスは有意に抑制され、その結果マウスの死亡率は有意に低下した¹⁵⁾。また、北村らはマウスの経気管的LPS注入モデルにおいても、Fas、FasLの発現亢進を介した肺上皮のアポトーシスが認められ、Fas中和抗体によって病変は抑制されたと報告している¹⁶⁾。これらの結果は、急性肺損傷における血管内皮細胞や肺上皮細胞のアポトーシスを制御すること、およびFas-FasL pathwayの重要性を示している。

マウスの免疫複合体惹起急性肺損傷モデル (immune complex alveolitis) は、卵白アルブミンに対する抗体を静注したのち、卵白アルブミンを吸入させ作成できる。このモデルでは肺胞上皮細胞におけるDNA傷害やアポトーシスの出現、FasL mRNAの発現増強も一過性であり、炎症の消退と共に消失する¹⁷⁾。これに対して、肺線維症のモデルであるブレオマイシン肺線維症で

は、全肺より抽出した DNA のゲル電気泳動によって DNA の断片化が認められ、TUNEL 染色によって、肺上皮細胞に陽性所見が認められる。電子顕微鏡によってプレオマイシン注入直後に細気管支上皮、注入 14 日後に肺胞上皮細胞にアポトーシスが認められる。Fas mRNA はプレオマイシン投与により肺胞上皮に発現が増強し、FasL mRNA は対照群には発現せず、プレオマイシン投与後の肺に浸潤する炎症細胞に発現しており、少なくとも 14 日後までその発現増強が持続する¹⁸⁾。また、ステロイド投与によって、肺の線維化は抑制されたが、同時にアポトーシスと Fas, FasL mRNA の発現も抑制され、プレオマイシン肺臓炎における線維化とアポトーシスおよび Fas-FasL pathway の関連性が示唆された。

Fas-FasL pathway が肺線維症の直接の原因であるか明らかにするために、マウスにアポトーシスを誘導する抗 Fas 抗体を連日吸入させると、プレオマイシン肺臓炎と同様に、リンパ球を中心とした炎症細胞の肺への集簇が起こり、細気管支上皮、肺胞上皮にアポトーシスが誘導され、組織学的にもハイドロキシプロリンの測定結果からも、肺線維症が形成されることが証明された¹⁹⁾。このことは、Fas-FasL pathway による細気管支上皮、肺胞上皮細胞の過剰なアポトーシス以外の作用、たとえば起炎症作用が、肺線維症の形成と関連していることを示唆していると考えられた。さらに、Fas または FasL 機能不全マウスにはプレオマイシン肺臓炎は起こりにくく、Fas-FasL pathway を阻害する Fas-Fc や抗 FasL 抗体を投与することで肺臓炎の形成を抑制できる²⁰⁾。これらの結果は、Fas-FasL pathway による肺上皮細胞のアポトーシスが、プレオマイシン肺臓炎・肺線維症の形成に重要であることを示している。

このように、Fas-FasL pathway は通常では炎症の消退、細胞性免疫に重要な役割をもっているが、その機能の破綻が起こると直接肺上皮細胞をアポトーシスに誘導し、基底膜傷害へと進行し、組織障害が引き起こされると考えられる。また好中球を主体とした炎症反応を誘導する炎症性サイトカインとしての側面も合わせもち、肺損傷、肺線維症の重要な因子の 1 つと考えられる。

2. TNF-TNFR 1 による肺上皮細胞のアポトーシス

TNF は様々な免疫、炎症反応に関与し、種々の炎症性疾患の病態にも深くかかわっている。TNF のレセプターとしては I 型 (TNFR 1) と II 型 (TNFR 2) の 2 つが知られている。これら 2 つのレセプターはほとんど全ての細胞に分布し同じ細胞上に両レセプターが発現していることが多いが、TNF が示す多様な作用の多くは death domain を有する TNFR 1 を介したものであり、TNFR 2 の関与は非常に限定的である。TNFR 1 は

Fas と共通のシグナル経路を介し、細胞内のアダプター分子を介して、アポトーシスの実行分子であるカスパーゼカスケードを活性化する。生理的な役割として、TNFR は胸腺における T 細胞のアポトーシスに関与しているとの報告があるが、TNFR 機能不全では Fas 機能不全にみられるような重大な免疫系の影響が生じないことから、TNFR を介するアポトーシス誘導が生体にとって本質的に重要であるかどうかは定かではない。

TNFR 1 は、アポトーシスのシグナルを伝えると同時に NF κ B を活性化する。NF κ B は、炎症性サイトカインや、接着因子の発現を誘導すると共に、細胞内のアポトーシス経路を阻害する蛋白である inhibitor of apoptosis (IAPs) の発現を誘導する²¹⁾。このため TNF は Fas-FasL pathway と異なり、多くの細胞においてアポトーシスを誘導するために代謝阻害剤を必要とすると考えられる。

しかしながら、これらの報告のほとんどは血液系細胞を使用した研究結果に基づいたものであり、分離細胞、初代培養細胞を用いた実験系では TNF- α が肺上皮細胞をアポトーシスに誘導し、肺損傷に関与するといった報告も散見される^{22),23)}。TNF による肺上皮細胞における IAPs の発現誘導が報告されているが²⁴⁾、この実験系も肺癌細胞株での報告である。TNF- α によるアポトーシスは、ミトコンドリアでの ROS (reactive oxygen species) の産生亢進を介することが示唆されているが²⁵⁾、この経路と、death-receptor を介する経路、さらに NF- κ B の活性化の経路が細胞によって、また環境によって複雑に制御されていると思われる。肺疾患における TNF によるアポトーシスや炎症性サイトカインの発現誘導の機序の解明は、炎症性肺疾患に対する新たな治療法の開発にとって重要と考えられる。

肺損傷・肺線維化における death-receptor 非依存性の肺上皮細胞のアポトーシス

抗癌剤、放射線、紫外線、増殖因子の除去などのストレス刺激が細胞内に伝達されると、細胞内の活性酸素、p 53, bcl-2 ファミリーなどのアポトーシス促進因子と抑制因子がミトコンドリアにおいて制御しあい、チトクローム c が放出されるとアポトーシスの実行因子であるカスパーゼが活性化する。

1. 肺上皮細胞のアポトーシスにおける p 53 および p 21 (Waf 1/Cip 1/Sdi 1)

細胞内で wild-type p 53 レベルが上昇すると細胞は G 1 で停止、またはアポトーシスを起こす。このような条件は細胞が紫外線、放射線、抗癌剤などで DNA に傷害を受けたとき、あるいは、wild-type p 53 を過剰発現

させたときに起こる。つまり、傷害を受けた DNA が修復されるまで細胞が S 期に入らないように G1 チェックポイントで細胞周期を止め、傷害によって誘発される変異を修復する、あるいは変異を受けた細胞をアポトーシスによって排除する役割をもつ。

p 21 は、p 53 によって、発現が誘導される蛋白質の 1 つであり、細胞周期制御において中心的役割を演じるサイクリン依存性キナーゼ (Cdk) に対する阻害活性を有する²⁶⁾。p 21 は、DNA 複製や修復にかかわる蛋白質である proliferating cell nuclear antigen (PCNA) と直接結合することによって、DNA 複製を抑制する²⁷⁾。また、正常細胞では、p 21, サイクリン, Cdk, PCNA の 4 種の蛋白質からなる複合体が存在する。従って、Cdk 活性および DNA 複製の阻害によって p 53 を介した細胞増殖の抑制や、細胞周期の調節に重要な役割を果たしている。

IIP は、いまだ原因不明の難治性疾患であるが、肺胞の胞隔炎から始まると考えられている。そこで我々は、IIP における DNA 損傷やアポトーシスと p 53, p 21 の発現に関して検討した。DNA 傷害やアポトーシスは TUNEL 法に従って、DNA 切断端を組織上で染色することによって検討した。また p 53 と p 21 の発現は免疫染色によって検討した。その結果、IIP のほとんどの症例の細気管支上皮および肺胞上皮細胞に TUNEL 陽性所見と p 53, p 21 の発現が認められるが、正常肺では認められなかった⁴⁾。細気管支上皮、肺胞上皮の DNA 損傷と p 53, p 21 の過剰発現は CVD-IP や慢性の線維化を伴う過敏性肺臓炎でも認められ、肺損傷に伴う線維化の過程に重要であると考えられた²⁸⁾。Guinee らは、DAD における肺胞 II 型上皮細胞に p 53, p 21 の発現増強に伴ってアポトーシスが誘導されることを報告している³⁾。また、Bardales らも ARDS, DAD において、肺胞 II 型上皮細胞にアポトーシスを観察している²⁾。肺損傷の程度が高度であるほど、アポトーシスが強く誘導されることが示唆されており、肺損傷時の肺上皮細胞のアポトーシスの程度が、肺損傷の予後を決める重要な因子の 1 つであると考えられる。

DNA 傷害と p 53, p 21 の発現についてはマウス肺損傷モデルにおいても認められる。急性肺損傷モデルとして immune complex alveolitis モデルを用いた。DNA 損傷は、TUNEL 法と全肺より抽出した DNA の電気泳動によって検出し、p 53, p 21 mRNA の発現は、RT-PCR, RT *in situ* PCR 法を用いて検討した。その結果、肺上皮細胞において、DNA 傷害やアポトーシスの出現も、p 53, p 21 mRNA の発現増強も一過性であり、炎症の消退と共に消失した²⁹⁾。この結果は、可逆的に治癒する急性肺損傷における修復に p 53, p 21 が関与することを示唆する所見と思われた。これに対して、

肺線維症のモデルであるブレオマイシン肺臓炎では、肺上皮細胞におけるアポトーシスがブレオマイシン気管内注入直後より生じて少なくとも 2 週間は継続する。この間、p 53 は少なくとも 1 週間、p 21 は 2 週間、発現の増強が継続していた³⁰⁾。これらの実験結果は、肺上皮細胞の DNA 傷害やアポトーシスが過剰であるか遷延することが線維化と関連することを示唆している。

2. 活性酸素と肺上皮細胞のアポトーシス

高濃度の酸素投与による肺損傷はよく知られているが、最近、O'Reilly らは、高濃度の酸素をマウスに暴露することによって、細気管支上皮、肺胞上皮細胞に DNA 傷害と p 53 の発現が誘導されることを報告している³¹⁾。また、同様に、p 21 の発現も肺上皮細胞に誘導され³²⁾、活性酸素によって、肺上皮細胞がアポトーシスに陥り、その過程に p 53 が関与し、p 21 の発現増強は細胞の増殖、DNA の修復に関与していると考えられる。また、Otterbein らは、高濃度の酸素を暴露する前にラットの肺に heme oxygenase-1 (HO-1) を遺伝子導入することによって、肺への好中球の集簇と肺上皮細胞のアポトーシスが抑制され、生存率の改善を認めている³³⁾。Hashiba らも同様に、influenza virus による肺損傷と肺線維化が HO-1 遺伝子導入によって有意に抑制されることを報告している³⁴⁾。また、Chan らは活性酸素による肺上皮細胞のアポトーシスの重要なシグナル伝達因子としてセラミド、その制御因子としてプロテインカイネーシスの重要性を報告している³⁵⁾。このように、酸素性肺損傷においても肺上皮細胞のアポトーシスが重要であると考えられる。さらに、Fas とそのアダプター分子である FADD は caspase に依存しないネクローシスのシグナルも伝達し、このネクローシスは抗酸化剤により阻害されることより、その経路にミトコンドリアからの活性酸素産生が関与している可能性が報告されている³⁶⁾。

3. 成長因子と肺上皮細胞のアポトーシス

Hastings らは、parathyroid hormone-related protein (PTHrP) が、急性肺傷害後の肺胞上皮細胞の再生、増殖に autocrine に働いていることを報告し³⁷⁾、さらに彼らは PTHrP に対するモノクローナル抗体を経気管的に投与すると、肺上皮にアポトーシスが誘導されること、また高濃度酸素性肺傷害モデルに PTHrP を投与することで、肺傷害が軽減されることを報告した³⁸⁾。Keratinocyte growth factor (KGF) や Hepatocyte growth factor (HGF) は、肺胞 II 型上皮の分裂、増殖にとって重要な因子であると同時に、肺傷害後の組織修復にとっても重要である。Buckley らは、KGF が高濃度酸素性肺傷害による肺胞上皮細胞のアポ

トーシスを抑制し、同時に急性肺傷害を抑制することを報告している³⁹⁾。Transforming growth factor- β (TGF- β) は、多機能性のサイトカインであり、肺損傷後の線維化期において key となる因子である。肝臓では、TGF- β は肝実質細胞の細胞死を誘導し、肝硬変の初期病因の 1 つとして重要であるとされるように、急性肺傷害における重要性についても報告されている⁴⁰⁾。我々の研究でも、TGF- β は単独で培養細気管支上皮細胞にアポトーシスを誘導し、さらに低濃度においても Fas シグナルを増強する作用をもつことが判明した。このように、TGF- β は肺損傷後の線維化期のみならず、肺損傷急性期においても肺上皮細胞のアポトーシスを介して組織障害と密接に関与してくるものと思われる。

肺上皮細胞と肺線維芽細胞の相互作用とアポトーシス

肺線維症において線維芽細胞と上皮細胞の相互作用が重要であることが知られている。高度の肺損傷と不十分な修復が正常な上皮と線維芽細胞の相互作用を妨げ、線維化へ至ることが考えられる。傷害を受けた肺胞構造の正常な修復には II 型肺胞上皮細胞の増殖と分化が必要であるが、その過程は線維芽細胞によって影響を受ける^{41), 42)}。Uhal らは、IIP の線維芽細胞あるいは、高濃度酸素暴露後のラットの肺より得た線維芽細胞は、その上清中に、ヒト培養肺上皮細胞にアポトーシスとネクローシスを誘導することを報告している⁴³⁾。さらにヒトの線維化肺には過形成性の II 型肺胞上皮細胞が認められるが、それらの多くは増殖しつつある細胞と細胞死に陥りつつある細胞が混在しており、特に線維芽細胞に隣接した肺胞上皮細胞にアポトーシスが認められることを報告している⁴⁴⁾。また、Terzaghi らは、上皮を剝離した気管片は速やかに線維化が進行するが、正常の気道上皮を移植することで線維化が制御されることを報告している⁴⁵⁾。このように、正常な肺上皮細胞は、線維芽細胞の増殖を制御していると考えられ、上皮細胞の損傷に伴う線維芽細胞との正常な相互作用の破綻が肺線維症の 1 つの要因と考えられる。Tan らは、HMG-CoA reductase inhibitor が線維芽細胞のアポトーシスを誘導することを報告している⁴⁶⁾。今後、肺胞上皮細胞のみならず線維芽細胞の増殖を制御することが重要な治療となることが予想される。

文 献

- 1) Polunovsky, V. A., Chen, B., Henke, C., Snover, D., Wendt, C., Ingbar, D. H., and Bitterman, P. B. (1993) Role of mesenchymal cell death in lung remodeling after injury. *J. Clin. Invest.* **92**, 388-397
- 2) Bardales, R. H., Xie, S. S., Schaefer, R. F., and Hsu, S. M. (1996) Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *Am. J. Pathol.* **149**, 845-852
- 3) Guinee, D., Jr., Fleming, M., Hayashi, T., Woodward, M., Zhang, J., Walls, J., Koss, M., Ferrans, V., and Travis, W. (1996) Association of p53 and WAF1 expression with apoptosis in diffuse alveolar damage. *Am. J. Pathol.* **149**, 531-538
- 4) Kuwano, K., Kunitake, R., Kawasaki, M., Nomoto, Y., Hagimoto, N., Nakanishi, Y., and Hara, N. (1996) p21^{Waf1/Cip1/Sd1} and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 477-483
- 5) Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233-243
- 6) Suda, T., Takahashi, T., Golstein, T., and Nagata, S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**, 1169-1178
- 7) Kuwano, K., Miyazaki, H., Hagimoto, N., Kawasaki, M., Fujita, M., Kunitake, R., Kaneko, Y., and Hara, N. (1999) The involvement of Fas-Fas ligand pathway in fibrosing lung diseases. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 53-60
- 8) Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* **119**, 493-501
- 9) Kuwano, K., Kawasaki, M., Maeyama, T., Hagimoto, N., Nakamura, N., Shirakawa, K., and Hara, N. (2000) Soluble form of Fas and Fas ligand in BAL fluid from patients with pulmonary fibrosis and bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *Chest* **118**, 451-458
- 10) Matute-Bello, G., Liles, W. C., Steinberg, K. P., Kiener, P. A., Mongovin, S., Chi, E. Y., Jonas, M., and Martin, T. R. (1999) Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury. *J. Immunol.* **163**, 2217-2225
- 11) Matute-Bello, G., Winn, R. K., Jonas, M., Chi, E. Y., Martin, T. R., and Liles, W. C. (2001) Fas (CD 95) induces alveolar epithelial cell apoptosis in vivo: implications for acute pulmonary inflammation. *Am. J. Pathol.* **158**, 153-161
- 12) Seino, K., Kayagaki, N., Okumura, K., and Yagita, H. (1997) Antitumor effect of locally produced CD 95 ligand. *Nat. Med.* **3**, 165-170
- 13) Alderson, M. R., Armitage, R. J., Maraskovsky, E., Tough, T. W., Roux, E., Schooley, K., Ramsdell, F., Lynch, D. H. (1993) Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **178**, 2231-2235
- 14) Hagimoto, N., Kuwano, K., Kawasaki, M., Yoshimi, M., Kaneko, Y., Kunitake, R., Maeyama, T., Tanaka, T., and Hara, N. (1999) Induction of interleukin-8 secretion and apoptosis in bronchiolar epithelial cells by Fas ligation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**, 436-445
- 15) Kawasaki, M., Kuwano, K., Hagimoto, N., Matsuba, T., Kunitake, R., Tanaka, T., Maeyama, T., and

- Hara, N. (2000) Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor. *Am. J. Pathol.* **157**, 597-603
- 16) Kitamura, Y., Hashimoto, S., Mizuta, N., Kobayashi, A., Kooguchi, K., Fujiwara, I., and Nakajima, H. (2001) Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 762-769.
 - 17) Nomoto, Y., Kuwano, K., Hagimoto, N., Kunitake, R., Kawasaki, M., and Hara, N. (1997) Apoptosis and Fas/Fas ligand mRNA expression in acute immune complex alveolitis in mice. *Eur. Respir. J.* **10**, 2351-2359
 - 18) Hagimoto, N., Kuwano, K., Nomoto, Y., Kunitake, R., and Hara, N. (1997) Apoptosis and expression of Fas/Fas ligand mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **16**, 91-101
 - 19) Kunitake, R., Fujita, M., Kawasaki, M., Kaneko, Y., and Hara, N. (1997) Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **17**, 272-278
 - 20) Kuwano, K., Hagimoto, N., Kawasaki, M., Yatomi, T., Nakamura, N., Nagata, S., Suda, T., Kunitake, R., Maeyama, T., Miyazaki, H., and Hara, N. (1999) Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* **104**, 13-19
 - 21) Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J. A., Binder, B. R., and Lipp, J. (1998) Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked IAP gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **188**, 211-216
 - 22) Liu, A. N., Mohammed, A. Z., Rice, W. R., Fiedeldej, D. T., Liebermann, J. S., Whitsett, J. A., Braciale, T. J., and Enelow, R. I. (1999) Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor-alpha: relative insensitivity to Fas ligand. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 849-858
 - 23) Vernooij, J. H., Dentener, M. A., van Suylen, R. J., Buurman, W. A., and Wouters, E. F. (2001) Intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells: no role for tumor necrosis factor-alpha and infiltrating neutrophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**, 569-576
 - 24) Pryhuber, G. S., Huyck, H. L., Staversky, R. J., Finkelstein, J. N., and O'Reilly, M. A. (2000) Tumor necrosis factor-alpha-induced lung cell expression of antiapoptotic genes TRAF1 and cIAP2. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 150-156
 - 25) Brown, L. A., Harris, F. L., and Guidot, D. M. (2001) Chronic ethanol ingestion potentiates TNF-alpha-mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **281**, L 377-386
 - 26) Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816
 - 27) Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-578
 - 28) Kunitake, R., Kuwano, K., Miyazaki, H., Kawasaki, M., Hagimoto, N., Fujita, M., Kaneko, Y., and Hara, N. (1998) Expression of p53, p21 (Waf1/Cip1/Sdi1) and Fas antigen in collagen vascular and granulomatous lung diseases. *Eur. Respir. J.* **12**, 920-925
 - 29) Kuwano, K., Hagimoto, N., Nomoto, Y., Kawasaki, M., Kunitake, R., Fujita, M., Miyazaki, H., and Hara, N. (1997) P53 and p21 (Waf1/Cip1) mRNA expression associated with DNA damage and repair in acute immune complex alveolitis in mice. *Lab. Invest.* **76**, 161-169
 - 30) Kuwano, K., Hagimoto, N., Kawasaki, M., Kaneko, Y., Matsuba, T., Maeyama, T., and Hara, N. (2000) Expression of apoptosis-regulatory genes in epithelial cells in pulmonary fibrosis in mice. *J. Pathol.* **190**, 221-229
 - 31) O'Reilly, M. A., Staversky, R. J., Stripp, B. R., and Finkelstein, J. N. (1998) Exposure to hyperoxia induces p53 expression in mouse lung epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **18**, 43-50
 - 32) O'Reilly, M. A., Staversky, R. J., Watkins, R. H., and Maniscalco, W. M. (1998) Accumulation of p21 (Cip1/WAF1) during hyperoxic lung injury in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**, 777-785
 - 33) Otterbein, L. E., Kolls, J. K., Mantell, L. L., Cook, J. L., Alam, J., and Choi, A. M. (1999) Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. *J. Clin. Invest.* **103**, 1047-1054
 - 34) Hashiba, T., Suzuki, M., Nagashima, Y., Suzuki, S., Inoue, S., Tsuburai, T., Matsuse, T., and Ishigatubo, Y. (2001) Adenovirus-mediated transfer of heme oxygenase-1 cDNA attenuates severe lung injury induced by the influenza virus in mice. *Gene Ther.* **8**, 1499-1507
 - 35) Chan, C., and Goldkorn, T. (2000) Ceramide path in human lung cell death. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 460-468
 - 36) Matsumura, H., Shimizu, Y., Ohsawa, Y., Kawahara, A., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2000) Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J. Cell Biol.* **151**, 1247-1256
 - 37) Hastings, R. H., Summers-Torres, D., Burton, D. W., and Deftos, L. T. (1999) Growth factor control of type II cell apoptosis. *Chest* **116**, 68
 - 38) Hastings, R. H., Berg, J. T., Summers-Torres, D., Burton, D. W., and Deftos, L. T. (2000) Parathyroid hormone-related protein reduces alveolar epithelial cell proliferation during lung injury in rats. *Am. J. Physiol.* **279**, L 194-L 200
 - 39) Buckley, S., Barsky, L., Driscoll, B., Weinberg, K., Anderson, K. D., and Warburton, D. (1998) Apoptosis and DNA damage in type 2 alveolar epithelial cells cultured from hyperoxic rats. *Am. J. Physiol.* **274**, L 714-720
 - 40) Pittet, J. F., Griffiths, M. J., Geiser, T., Kaminski, N., Dalton, S. L., Huang, X., Brown, L. A., Gotwals, P. J., Kotliansky, V. E., Matthay, M. A., and Sheppard, D. (2001) TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. *J. Clin. Invest.* **107**, 1537-1544
 - 41) Mason, R. J., Leslie, C. C., McCormick-Shannon, K., Deterding, R. R., Nakamura, T., Rubin, J. S., and Shannon, J. M. (1994) Hepatocyte growth factor is a growth factor for rat alveolar type II cells. *Am. J.*

- Respir. Cell Mol. Biol. **11**, 561-567
- 42) Panos, R. J., Rubin, J. S., Csaky, K. G., Aaronson, S. A., and Mason, R. J. (1993) Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. *J. Clin. Invest.* **92**, 969-977
 - 43) Uhal, B. D., Joshi, I., True, A. L., Mundle, S., Raza, A., Pardo, A., and Selman, M. (1995) Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am. J. Physiol.* **269**, L 819-828.
 - 44) Uhal, B. D., Joshi, I., Hughes, W. F., Ramos, C., Pardo, A., and Selman, M. (1998) Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am. J. Physiol.* **275**, L 1192-1199
 - 45) Terzaghi, M., Nettekheim, P., and Williams, M. L. (1978) Repopulation of denuded tracheal grafts with normal, preneoplastic, and neoplastic epithelial cell populations. *Cancer Res.* **38**, 4546-4553
 - 46) Tan, A., Levrey, H., Dahm, C., Polunovsky, V. A., Rubins, J., and Bitterman, P. B. (1999) Lovastatin induces fibroblast apoptosis in vitro and in vivo. A possible therapy for fibroproliferative disorders. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 220-227