

難治性肺線維性疾患におけるPeroxi-redoxin-6 (PRDX-6) の発現に関する検討

鳥取大学医学部統合内科医学講座分子制御内科学分野 (主任 清水英治教授)

高田美樹, 橋本 潔

Peroxi-redoxin-6 (PRDX-6) expression in refractory pulmonary fibrosis: prognostic implications

Miki TAKATA, Kiyoshi HASHIMOTO

*Division of Medical Oncology and Molecular Respirology, Department of Multidisciplinary
Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683-8504, Japan*

ABSTRACT

Refractory pulmonary fibrosis is a progressive and fatal lung disease. Although the fibrosing mechanisms are not fully understood, recent findings suggest that redox imbalance may play an important role in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Peroxi-redoxin-6 (PRDX-6) is a peroxidase enzyme that is expressed at a high level in the lung. To identify differentially expressed bronchoalveolar lavage fluid (BALF) proteins on bleomycin-induced mice compared to vehicle-treated mice (negative control: NC), we performed proteomic approaches using shotgun protein analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). PRDX-6 expression in BALF was significantly lower on bleomycin-induced mice than that on NC ($p=0.000-0.051$). Furthermore, BALF PRDX-6 was significantly suppressed on mice with comparatively mild degree of pulmonary fibrosis after bleomycin treatment. We performed immunohistochemical analyses of pulmonary PRDX-6 in 13 patients with refractory pulmonary fibroses, including fibrotic non-specific interstitial pneumonia (fNSIPs, $n=9$), idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia (IPF/UIP, $n=3$) and chronic hypersensitivity pneumonitis (chronic HP, $n=1$). The Kaplan-Meier method revealed that refractory pulmonary fibrosis patients with low expression of PRDX-6 ($n=5$) had a significantly poorer prognosis than those with high expression of PRDX-6 ($n=8$) (log-rank $p=0.039$). These results indicate that suppression of PRDX-6 may have an important role in progression of refractory pulmonary fibrosis. (Accepted on December 28, 2011)

Key words : pulmonary fibrosis, peroxi-redoxin-6, redox imbalance, immunohistochemistry, liquid chromatography-tandem mass spectrometry

はじめに

難治性肺線維性疾患の代表的な疾患の一つとして、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) が挙げられる。IPFは慢性かつ進行性の経過をとり、高度の線維化と肺胞構築の改変を呈し、不可逆的な蜂巣肺を形成する。原因は不明であり、罹患率は10万人に対して14.0~42.7人程度と報告される¹⁾。病理学的には通常型間質性肺炎 (usual interstitial pneumonia: UIP) を呈し、有効な治療法は乏しく、5年生存率は30~50%と予後不良である。

また、線維性非特異性間質性肺炎 (fibrotic non-specific interstitial pneumonia: fNSIP) は、特発性NSIPのうち、慢性かつ進行性に肺の線維化を来す亜型であり²⁾、細胞浸潤性非特異性間質性肺炎 (cellular NSIP: cNSIP) と比べ予後不良である³⁾。NSIPの予後は、全体としてはIPF/UIPと比較して良好であるが、線維化が強く肺機能の低下したfNSIPの予後はIPF/UIPと同等であるとする報告もある⁴⁾。

一方、過敏性肺炎 (hypersensitivity pneumonitis: HP) は、真菌・酵母・化学物質等の抗原物質により感作された個体が再び抗原物質を吸入することで発症するⅢ~Ⅳ型アレルギー性肺疾患である。HPはその経過から、急性 (acute HP)、亜急性 (subacute HP)、慢性 (chronic HP) に分類される⁵⁾。Chronic HPは、潜在的に進行するため診断が困難であり、発見された時には肺に既に線維化を認めることが多い。進行期には広範な蜂巣肺を伴うため、IPF/UIPとの鑑別が困難である。病理学的にもNSIPやUIPと類似する症例が多い⁶⁾。

これらの難治性肺線維性疾患では、慢性経過中に両肺野に新たな陰影の出現とともに急速に呼吸不全が進行する急性増悪と言われる病態がみられる。急性増悪を起こした場合、治療抵抗性で死亡率は極めて高い^{7,8)}。

これまで難治性肺線維性疾患の病態に関しては、肺胞領域の炎症すなわち胞隔炎にはじまり、組織修復に伴い線維化を生じる慢性進行性の疾患で、病態の中心は慢性炎症であると考えられてきた。そのためステロイドをはじめとする抗炎症療法が治療の中心を担ってきたが、その効果を支持するエビデンスは乏しい。このような経緯から、

難治性肺線維性疾患の病態は慢性の肺胞上皮障害とそれに引き続いて起こる異常修復であるとする炎症を重視しない説も提唱されている¹⁰⁾。近年、実験的肺線維症モデル動物や遺伝子改変動物を用いた実験により、形質転換増殖因子 (transforming growth factor: TGF) - β や血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) などの増殖因子、アラキドン酸代謝産物、Fas-Fas ligand経路を介する肺胞上皮細胞のアポトーシス、レドックスインバランスにより生じる活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF) - α やインターロイキン (interleukin: IL) -1 β などのサイトカインやTh1/Th2バランスに関与するインターフェロン (interferon: IFN) - γ やIL-4などのサイトカイン、単球走化性タンパク質 (monocyte chemoattractant protein: MCP) -1などのケモカインが病態に関与していることが報告されている^{11,12)}。しかしながら、肺の線維化の進展プロセスには未だ不明な点が多い。これらのことから、難治性肺線維性疾患の進展、増悪の鍵を握る分子を探索する意義は大きいと考えられる。

また、近年タンパク質解析の技術が著しく進歩し、種々の疾患の病態解明においてプロテオーム解析を用いたアプローチが頻繁に行われている。呼吸器疾患においては、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) を用いた解析が中心となっており、IPF/UIPやHP、サルコイドーシス、強皮症に伴った間質性肺炎などにおけるプロテオーム解析の報告がある^{13,14)}。プロテオーム解析の分野では、これまで二次元電気泳動法 (two-dimensional electrophoresis: 2-DE) が最も広く行われており有用性も確立されている。一方で、近年2-DE と質量分析を順次行う古典的な解析法に代わり、生体から分離したタンパク質混合物のプロテアーゼ消化後に得られたペプチド混合物を、直接液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析装置 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC/MS/MS) で分析するショットガン法が開発された。この方法は、ゲルの切り出しなどの過程を経ずに直接サンプルから解析が行え、2-DEでは解析困難であった高分子量タンパク質や塩基性タンパク質の解析も可能であり、より多くの発現タンパク質を解析できる利点がある¹⁵⁾。また安定同位体標識試薬を使用するこ

とにより、タンパク質を相対的に定量し、発現タンパク質の量的有意差に関しても同時に分析できるようになった¹⁶⁾。今回我々は、難治性肺線維性疾患の病態解析としてはじめて本法を用いたプロテオーム解析を行い、重症化の鍵を握る分子について探索を行った。

Peroxiredoxin-6 (PRDX-6) は、過酸化水素などを分解する酸化還元酵素であるペルオキシダーゼの一つであり、細胞のレドックス制御に関与するタンパク質である。ペルオキシダーゼ活性以外にもCa²⁺非依存性ホスホリパーゼA₂ (phospholipase A₂; PLA₂) 活性も持つ二機能性酵素である¹⁷⁾ ことが知られている。これまで、PRDX-6をアデノウイルスベクターを用いて高発現させたトランスジェニックマウスで、高濃度酸素暴露による肺傷害が減少し、生存期間が延長したとの報告や¹⁸⁾、リポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) 誘発肺傷害マウスにおいて、PRDX-6をノックアウトさせた場合、顕著に肺の線維化や炎症が助長されたとの報告¹⁹⁾ がみられる。今回我々が行ったプロテオーム解析でもPRDX-6は注目に値する分子であると考えられたため、実際の難治性肺線維性疾患患者の肺組織を用いた免疫組織化学的検討を加えた。

材料および方法

実験動物

野生型 C57BL/6N (Charles River Japan, Inc., Yokohama, Japan) マウスを、体重14.5 g から 15.0 g 前後に成長させた後に使用した。本研究は鳥取大学医学部倫理審査委員会による審査と承認のもとで行った。

BLM誘発肺線維症モデルマウス (BLMモデル) の作製

ブレオマイシン (bleomycin: BLM, プレオ注射用 5 mg, Nippon Kayaku Co., Tokyo, Japan) 1バイアルを、生理食塩水 (生食) 400 μ l で溶解した。この溶液を、浸透圧ポンプ (model 2001: Alza Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, USA) 1個につき200 μ l 注入し、BLMモデル用とした。ネガティブコントロール (negative control: NC) には、生食200 μ l のみを入れたポンプを使用した。マウスをジエチルエーテル (Wako, Osaka, Japan) 吸入麻酔後、後頸部の皮膚に切開を加え、背部の皮下を鈍的に剥離した。皮下に作製したスパー

スにポンプを挿入後縫合した²⁰⁾。ポンプ挿入日を day 1とした。

気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL)

day10からday39のマウスに対して、ジエチルエーテル麻酔後、経心腔脱血処理により屠殺し、全肺に対して6 mlの生食を用いてBALを行った。回収したBALFは1,300 rpm, 10 min, 4°Cで遠沈後、cell pelletをスライドグラスに塗抹しDiff-Quick染色 (SYSMEX CORPORATION, Kobe, Japan) 後、光学顕微鏡にて白血球細胞分画を算定した。BALF上清はプロテオーム解析用とした。

組織採取

BAL終了後、右肺組織を採取し、10 ml注射器筒内で十分陰圧をかけて膨らませ、通常処理過程を経た後、H-E染色標本を作成した。

肺の病理組織学的解析

肺組織の線維化状態は、マウス肺のH-E染色標本を用いて、Ashcroftらの報告²¹⁾ を参考に評価した。肺の線維化の程度に応じてFibrotic score (FS) を、0.00 (線維化なし) から 8.00 (完全な線維性組織) の範囲内でスコアリングした。

実験動物として作製したBLMモデル雄10匹、雌17匹のFSを参考に、適度にFSの分かれた雄、雌4匹ずつのBLMモデルを本研究の実験対象とした。またNCには、作製したマウスの雄11匹、雌15匹の中から、各々のBLMモデルと性別、週齢、ポンプ挿入時の体重が同等であるマウスを雄、雌それぞれ4匹ずつ選択した。

タンパク質の精製

BALF上清800 μ lを遠心分離 (10,000 rpm, 10 min, 4°C) し、その上清500 μ lを限外ろ過カートリッジ (Amicon Ultra-0.5 ml 10 K, Millipore, Billerica, USA) を用いて、遠心分離 (14,000 rpm, 15 min, room air) した。ろ液を廃棄し、50 mM triethylammonium hydrogencarbonate solution (TEAB, Wako, Osaka, Japan) を加え遠心分離を行い、これらを4回反復した。膜上に残ったタンパク質溶液約30 μ lを遠心分離 (1,000 rpm, 2 min, room air) し、測定用サンプルとした。

サンプル溶液中のタンパク質濃度が100 μ g / 20 μ lとなるように500 mM TEABで濃度調整を行い、20 μ lをiTRAQ Reagent Multi-Plex Kit (AB Sciex, Foster City, USA) により還元、システインブロックした後、トリプシン消化した。

iTRAQ Reagent Multi-Plex Kit内の4種の安定

同位体標識試薬を用いて各サンプルのペプチド混合物をラベルした後、すべてのサンプルを混和した。サンプルをpH 2.5から3.3に調整後、陽イオン交換カラム (ICAT Cartridge-Cation Exchange: AB Sciex, Foster City, USA) を用いて精製し、得られた各1 mlのフラクションサンプル6種類を、遠心濃縮機/低温トラップ (TIETECH, Nagoya, Japan) により100 μ lになるまで39 $^{\circ}$ C、12時間から15時間遠心濃縮した。

濃縮した溶液に、全量が1 mlとなるように0.1%ギ酸 (Wako, Osaka, Japan) を加え、カラム (Sep-Pak Light C18 Cartridges, Waters, Milford, USA) を用いて固相抽出を行い、その溶出画分1 ml を再度遠心濃縮機/低温トラップにより、100 μ l になるまで39 $^{\circ}$ C、5時間から8時間遠心濃縮し、最終サンプル溶液とした。

プロテオーム解析

最終サンプル溶液20 μ lを用いて、LC/MS/MS (QTRAP 5500, Applied Biosystems, Carlsbad, USA) による解析を行った。Protein Pilot ソフトウェア (AB Sciex, Foster City, USA) を用いて、LC/MS/MSで取得したデータより、タンパク質の同定および定量を行った。

難治性肺線維性疾患患者と生検肺組織

平成12年から平成23年の間に当院において video assisted thoracoscopic surgery (VATS) 下肺生検を施行しfNSIP, IPF/UIPまたはchronic HPと総合診断した13例を対象とした。生検肺組織は通常法により固定し、パラフィン包埋した。病理組織学的診断は2名の異なる病理医により行い、診断に乖離が生じた場合には、呼吸器内科医、放射線科医、病理医の総合討議によるClinico-Radiological-Pathological Diagnosisをもって総合診断とした。本検討は、ヘルシンキ宣言に準拠し、鳥取大学医学部倫理審査委員会の審査と承認のもとで行った。

免疫組織化学

組織切片を35 μ mに薄切し、シランコーティングスライドガラス上で乾燥させたものを実験サンプルとした。抗原賦活に関しては、0.01 mol/l リン酸緩衝液 (pH 6.0) 内で92 $^{\circ}$ C、20分間のマイクロウェーブ処理を行った。使用した1次抗体は、anti Peroxiredoxin-6 (PRDX-6) antibody (Abcam, rabbit polyclonal, 1 μ g/ml) であり、免疫反応はstreptavidin- biotin- peroxidase

complex technique (SAB) 法を用いて検出し、発色はdiaminobenzidine (DAB) により行い、hematoxylinを用いて核染色を行った。生検組織内の気管支上皮細胞における陽性反応を内因性陽性コントロールとし、その近傍で増殖した線維性組織内または近傍の肺泡マクロファージ内に陽性コントロールと同等以上の反応が観察された場合に、PRDX-6陽性であると判定した。同様の実験を3回反復し、それら全てにおいて同様の結果が得られたことを確認した。

統計学的解析

マウスのBALF検体間のタンパク質発現量の差異に関しては、t検定により解析した。種々の臨床病理学的因子間の相関に関しては、 χ^2 検定またはFisherの直接確率計算およびMann-Whitney検定により解析した。生存分析はKaplan-Meier法を用いて行い、log-rank 法による有意差検定を行った。いずれの検定においても、 $p < 0.05$ をもって統計学的な有意差があるものと判断した。

結 果

マウスの背景とBALF所見

表1に、マウスの個体識別番号とそれぞれの性別、ポンプ挿入時の体重、解剖時のポンプ挿入日数と生後週齢、BALFの回収率、白血球分画、FSを示した (BLM誘発肺線維症モデルマウス：表1-a, NC：表1-b)。

BLMモデル群におけるBALFのマクロファージ分画は、NCと比較し有意に少なく ($p = 0.0008$)、リンパ球分画 ($p = 0.0008$) や好中球分画 ($p = 0.0094$) はBLMモデル群で有意に多い結果が得られた。なお、好酸球はどちらの群においても検出されなかった。

FSに関しては、雄は0.25, 0.50, 2.00, 2.50, 雌は0.25, 1.50, 2.50, 3.50と線維化の比較的低度なものから比較的高度なものまで、FSが偏らないように選択した。

NCに関しては、性別、週齢、ポンプ挿入時の体重が8匹のBLMモデルそれぞれと同等になるよう雄、雌4匹ずつ選択し、各々のBLMモデルに対応する個体番号とした (BLM1-NC1, BLM2-NC2, BLM3-NC3, BLM4-NC4, BLM5-NC5, BLM6-NC6, BLM7-NC7, BLM8-NC8)。

肺組織の病理組織学的評価

図1にBLM誘発肺線維症モデルマウスの雄の肺

表1

a BLM誘発肺線維症モデルマウスの背景とBALF所見

個体番号	性別	ポンプ挿入時		解剖時		回収率 (%)	BALF 細胞分画 (%)				肺組織評価 Fibrotic score (FS)
		体重 (g)	ポンプ挿入時からの日数 (日)	週齢 (週)	Mφ		Lym	Neu	Eo		
BLM1	♂	14.7	18	7	81	86.0	6.5	7.5	0.0	0.25	
BLM2	♂	14.7	13	6	73	74.0	15.0	11.0	0.0	0.50	
BLM3	♂	14.9	39	10	81	87.0	12.5	0.5	0.0	2.00	
BLM4	♂	15.1	32	9	70	79.0	19.0	2.0	0.0	2.50	
BLM5	♀	14.5	10	6	70	73.0	15.0	12.0	0.0	0.25	
BLM6	♀	14.1	32	9	83	82.0	17.0	1.0	0.0	1.50	
BLM7	♀	14.5	24	8	90	43.5	38.5	18.0	0.0	2.50	
BLM8	♀	14.4	18	7	57	18.5	72.8	8.8	0.0	3.50	

b NCの背景とBALF所見

個体番号	性別	ポンプ挿入時		解剖時		回収率 (%)	BALF 細胞分画 (%)				肺組織評価 Fibrotic score (FS)
		体重 (g)	ポンプ挿入時からの日数 (日)	週齢 (週)	Mφ		Lym	Neu	Eo		
NC1	♂	15.0	18	7	87	95.5	4.0	0.5	0.0	0.00	
NC2	♂	14.3	14	6	87	99.0	1.0	0.0	0.0	0.00	
NC3	♂	14.7	39	10	83	99.0	1.0	0.0	0.0	0.00	
NC4	♂	15.1	32	9	83	96.5	3.5	0.0	0.0	0.00	
NC5	♀	14.8	10	6	80	96.0	1.5	2.5	0.0	0.00	
NC6	♀	14.6	32	9	80	96.0	4.0	0.0	0.0	0.00	
NC7	♀	14.4	25	8	83	96.5	2.5	1.0	0.0	0.00	
NC8	♀	14.5	17	7	83	93.5	4.5	2.0	0.0	0.00	

組織標本を示した。各々のBLMモデルにおいて程度は異なるものの、胸膜直下および小葉中心部優位に線維性病変が種々の程度に観察され（矢印）、肺胞隔壁は線維性に肥厚し、炎症細胞の浸潤がみられた（矢頭）。雌に関しても、FSは異なるものの同様の所見が認められた。

BALFプロテオーム解析におけるPRDX-6の発現

まずはじめに、性別、週齢、体重が同等なBLMモデルとNC間における発現タンパク質の種類と量の比較を行い、BLMモデルで有意に高発現または低発現しているタンパク質を選別した。その中から、FSの異なるBLMモデル間において発現量に有意差を認めるタンパク質を選別した。この中から雄、雌で共通のタンパク質を選別した。こうして選別したタンパク質のうち、FSの程度によるタンパク質発現量が雄、雌共通のパターンを示し、かつNCとは全く異なるパターンを示したPRDX-6に我々は注目した。

各NCにおけるPRDX-6の発現量を1とした時の、それぞれに対応するBLMモデルにおける相対発現量を示す（雄：図2-a, 雌：図2-c）。全てのBLMモデルにおいて、PRDX-6相対発現量は各NCと比較し有意に低値であった（BLM1/NC1： $p = 0.000$, BLM2/NC2： $p = 0.005$, BLM3/NC3： $p = 0.000$, BLM4/NC4： $p = 0.002$, BLM5/NC5： $p = 0.001$, BLM6/NC6： $p = 0.000$, BLM7/NC7： $p = 0.002$, BLM8/NC8： $p = 0.000$ ）。

また雄のBLMモデル同士の比較では（図2-b）、FSが最も低いBLM1と比較し、BLM3、BLM4でPRDX-6相対発現量が有意に低値であった（BLM3/BLM1： $p = 0.014$, BLM4/BLM1： $p = 0.002$ ）。雌のBLMモデル同士の比較では（図2-d）、FSが最も低いBLM5と比較し、BLM6、BLM7のPRDX-6相対発現量が有意に低値であった（BLM6/BLM5： $p = 0.040$, BLM7/BLM5： $p = 0.029$ ）。

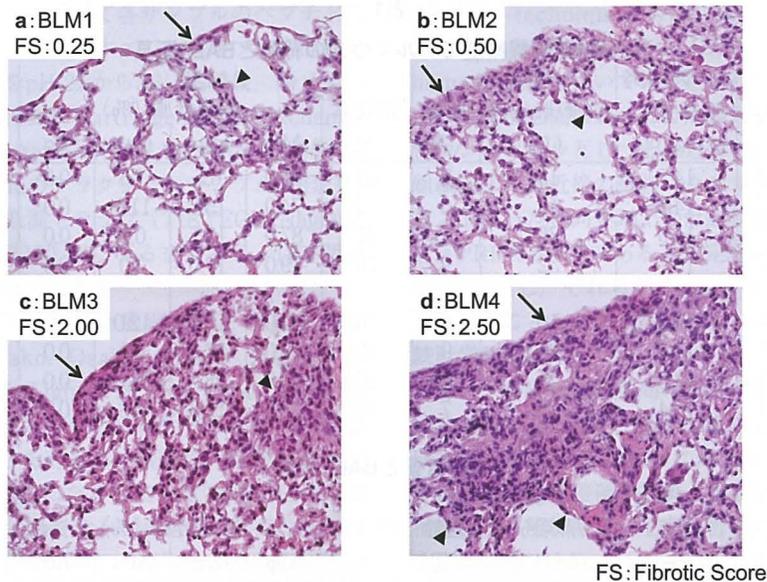


図1 プレオマイシン (bleomycin: BLM) 誘発肺線維症モデルマウスの肺組織標本

C57BL/6NマウスにBLMを持続皮下投与し、BLM誘発肺線維症モデルマウスを作製した。プロテオーム解析に用いたマウスの肺組織H-E標本を示す。いずれの肺組織でも、胸膜直下および小葉中心部優位の線維性病変 (矢印)、肺胞隔壁の線維性肥厚、炎症細胞浸潤 (矢頭) を認めている。病変の重症度に関しては、Ashcroftらの報告をもとにスコアリングを行った (fibrotic score: FS)。BLM1のFSは0.25 (a)、BLM2のFSは0.50 (b)、BLM3のFSは2.00 (c)、BLM4のFSは2.50 (d) であった。

BLMモデルにおけるPRDX-6の発現量は、線維化が比較的軽度な段階で一旦低下し、比較的高度になると再び上昇するというパターンを示した (図2-b, d)。これは性別に関わらず共通の発現パターンであった。一方、NCにおけるPRDX-6は、NC2, 3において一旦上昇した発現量がNC4で再び低下するという発現パターンを示し、これは雌においても同様であった (未掲載データ)。すなわち、BLMモデルにおけるPRDX-6の発現パターンは雄、雌共通のパターンを示す一方、NCとは全く異なるパターンを呈した。

検討の対象とした難治性肺線維性疾患患者の各種臨床病理学的因子

VATS下肺生検を施行した13症例の内訳は、男性8例、女性5例、年齢は50歳から75歳であった。喫煙歴は8例がnever smoker, 1例がformer smoker, 4例がcurrent smokerであった。総合診断はfNSIPが9例、IPF/UIPが3例、chronic HPが1例であった。IPF/UIPの1例に関しては、病理

組織診断がfNSIPとUIPに乖離したため、呼吸器内科医、放射線科医、病理医の総合討議によりIPF/UIPと総合診断した。13例中6例が死亡し、死因に関しては6例全てが原病の急性増悪であった (表2)。

肺生検組織を用いたPRDX-6の免疫組織化学的検討

VATS下肺生検組織を用いた免疫組織化学の結果を呈示する (図3)。13症例全ての標本において、気管支上皮細胞やII型肺胞上皮細胞の細胞質内、また肺胞マクロファージ内にPRDX-6の免疫反応が認められた。aおよびbはPRDX-6陽性であった2症例であるが、気管支上皮細胞 (矢頭) の近傍で増殖した線維性組織内または肺胞マクロファージ内に内因性陽性反応と同等以上の免疫反応が認められた (矢印)。一方、cおよびdは陰性であった2症例であるが、気管支上皮細胞 (矢頭) 近傍の線維性組織や肺胞マクロファージ内に内因性陽性反応と同等以上の免疫反応は認められなかった

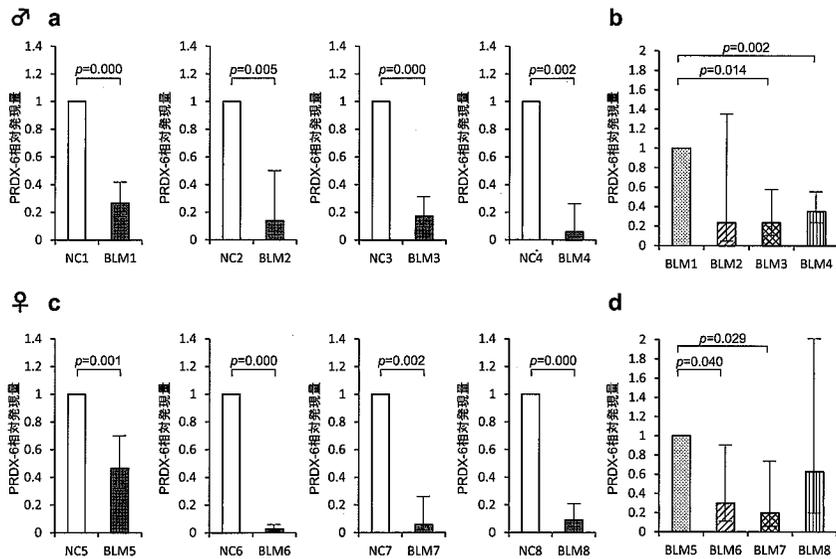


図2 マウス気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) プロテオーム解析におけるPeroxiredoxin-6 (PRDX-6) の発現

ブレオマイシン (bleomycin: BLM) 誘発肺線維症モデルマウス (BLMモデル, n=8) とネガティブコントロール (negative control: NC, n=8) より採取したBALFを、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析装置 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC/MS/MS) を用いて解析した。BLMモデルとNC間 (a, c)、および異なるFSを呈するBLM間 (b, d) におけるPRDX-6の発現状況を示している。

a : 雄のBLMモデルとNCにおけるPRDX-6相対発現量の比較。各NCにおけるPRDX-6の発現量を1とした時の、それぞれに対応するBLMモデルにおけるPRDX-6相対発現量を示している。いずれのBLMモデルにおいても、NCと比較しPRDX-6相対発現量は有意に低値を示している (BLM1/NC1 : $p = 0.000$, BLM2/NC2 : $p = 0.005$, BLM3/NC3 : $p = 0.000$, BLM4/NC4 : $p = 0.002$)。

b : 雄のBLMモデル同士のPRDX-6相対発現量の比較。FSの最も低いBLM1 (FS 0.25) と比較し、BLM3 (FS 2.00), BLM4 (FS 2.50) でPRDX-6相対発現量は有意に低値を示している (BLM3/BLM1 : $p = 0.014$, BLM4/BLM1 : $p = 0.002$)。

c : 雌のBLMモデルとNCにおけるPRDX-6相対発現量の比較。各NCにおけるPRDX-6の発現量を1とした時の、それぞれに対応するBLMモデルにおけるPRDX-6相対発現量を示している。いずれのBLMモデルにおいても、NCと比較しPRDX-6相対発現量は有意に低値を示している (BLM5/NC5 : $p = 0.001$, BLM6/NC6 : $p = 0.000$, BLM7/NC7 : $p = 0.002$, BLM8/NC8 : $p = 0.000$)。

d : 雌のBLMモデル同士のPRDX-6相対発現量の比較。FSの最も低いBLM5 (FS 0.25) と比較し、BLM6 (FS 1.50), BLM7 (FS 2.50) でPRDX-6相対発現量は有意に低値を示している (BLM6/BLM5 : $p = 0.040$, BLM7/BLM5 : $p = 0.029$)。

(矢印)。

全13症例中、8例がPRDX-6陽性、5例がPRDX-6陰性であった (表2)。

PRDX-6の発現と各種臨床因子との相関

PRDX-6の発現状況が各種臨床因子と相関しているか否かについて統計学的な解析を行った (表3)。PRDX-6の発現は、年齢、性別、総合診断、

表2 外科的肺生検を施行した13症例の臨床病理学的因子

症例	年齢 (歳)	性別	総合診断	生命予後	生存期間 (週)	死因	喫煙歴	KL-6 (U/ml)	AaDO ₂ (Torr)	%VC (%)	%DL _{CO} (%)	PRDX-6
1	50	女	fNSIP	生存	236		never	278	10.8	90.2	68.7	陰性
2	58	女	fNSIP	生存	336		current	731	7.5	91.7	63.2	陽性
3	53	女	fNSIP	生存	341		current	8681	23.1	73.0	34.9	陽性
4	72	男	fNSIP	死亡	300	急性増悪	never	1358	9.0	117.8	71.5	陽性
5	64	女	fNSIP	生存	486		never	2697	32.4	60.9	41.4	陽性
6	64	男	IPF/UIP	死亡	640	急性増悪	former	1100	21.7	95.8	39.3	陽性
7	75	男	fNSIP	死亡	119	急性増悪	never	2178	34.2	56.2	28.2	陰性
8	68	男	chronic HP	生存	254		never	1236	21.6	72.5	54.8	陰性
9	62	男	fNSIP	死亡	65	急性増悪	current	1614	26.8	63.8	*	陰性
10	62	男	fNSIP	死亡	104	急性増悪	never	1125	34.8	67.1	36.4	陰性
11	66	男	fNSIP	死亡	249	急性増悪	current	1700	18.6	78.1	43.7	陽性
12	50	男	IPF/UIP	生存	218		never	607	5.1	86.4	54.5	陽性
13	69	女	IPF/UIP	生存	109		never	109	13.5	61.1	42.4	陽性

*: 症例9のDL_{CO}は施行できず

fNSIP: fibrotic non-specific interstitial pneumonia, IPF/UIP: idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia, HP: hypersensitivity pneumonitis

喫煙歴、在宅酸素療法 (Home oxygen therapy: HOT) 施行歴やステロイド・免疫抑制剤使用歴と何ら相関を示さなかった。また血清KL-6値、肺動脈血酸素分圧格差 (alveolar-arterial oxygen tension difference: AaDO₂)、%肺活量 (% vital capacity: %VC)、%肺拡散能 (% diffusing capacity for carbon monoxide: %DL_{CO}) も同様にPRDX-6の発現と相関を示さなかった。

生存分析

Kaplan-Meier法を用いて行った難治性肺線維性疾患13症例の生存分析の結果を呈示する (図4)。PRDX-6陽性例の平均生存期間は334.9週、PRDX-6陰性例の平均生存期間は155.6週であった。log-rank法による解析の結果、PRDX-6陽性例とPRDX-6陰性例の間には生命予後に有意な差異が認められた ($p = 0.039$)。すなわちPRDX-6陰性例の方がPRDX-6陽性例に比べて有意に予後不良であった。

考 察

PRDX-6は、最近発見された強い抗酸化作用を持つペルオキシダーゼであるPRDXファミリーに属し、細胞のレドックス制御に関与する。哺乳類においてPRDXには、PRDX-1から6の6種類

のアイソフォームがあることが知られており、PRDX-1から5はN末端側とC末端側に保存された2つのシステイン残基を持ち (2-Cys PRDX)、チオレドキシンを酸化還元電子供与体として使用するのに対して、PRDX-6はC末端側のシステイン残基を欠き (1-Cys PRDX)、グルタチオン (glutathione: GSH) を電子供与体として利用する²²⁾。また、PRDX-6はペルオキシダーゼ活性以外にもCa²⁺非依存性PLA₂活性も有している¹⁷⁾。PRDX-6は全ての主要臓器で発現しているが、肺で特に顕著に発現しており²³⁾、中でも気管支上皮細胞やII型肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ等で発現がみられると報告される^{24,25)}。

近年、このPRDX-6に関しては、肺の線維化との関係を検討した報告が散見される。PRDX-6のノックアウトマウスで、LPSによる肺の炎症、線維化が増悪したとの報告¹⁹⁾や、PRDX-6を高発現させたトランスジェニックマウスにおいて、高濃度酸素暴露による肺傷害が減少し、生存期間が延長したとの報告があり¹⁸⁾、PRDX-6は肺の線維化抑制にある一定の役割を果たしている可能性がある。今回我々が世界に先駆けて行ったBLM誘発肺線維症モデルマウスのBALFを用いたショットガンプロテオーム解析でも、PRDX-6の発現は

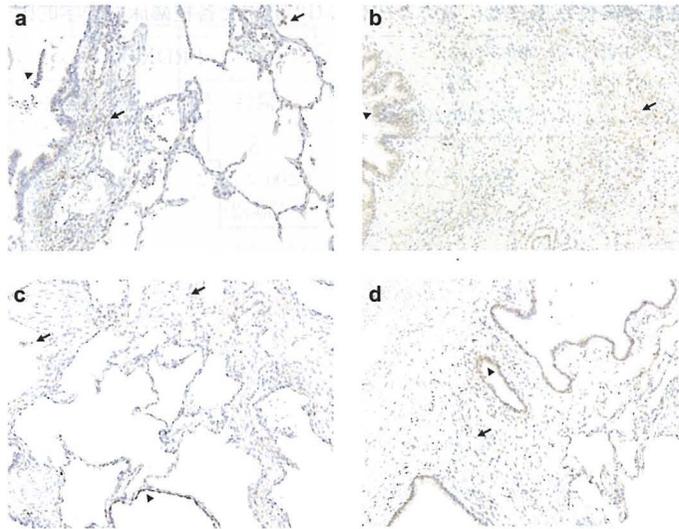


図3 Video assisted thoracoscopic surgery (VATS) 下肺生検組織を用いた Peroxiredoxin-6 (PRDX-6) の免疫組織化学

難治性肺線維性疾患と診断された13症例のVATS下肺生検組織を用い、PRDX-6の免疫組織化学を行った。全ての症例において、気管支上皮細胞やII型肺胞上皮細胞の細胞質内、また肺胞マクロファージ内にPRDX-6の免疫反応が認められた。生検組織内の気管支上皮細胞における陽性反応を内因性陽性コントロールとし、その近傍で増殖した線維性組織内または近傍の肺胞マクロファージ内に陽性コントロールと同等以上の反応が観察された場合にPRDX-6陽性であると判定した。結果は、8例がPRDX-6陽性、5例がPRDX-6陰性であった。陽性例2例 (a, b)、陰性例2例 (c, d) の結果を呈示する。

a, b : PRDX-6陽性例の免疫組織化学。気管支上皮細胞 (矢頭) の近傍で増殖した線維性組織内または肺胞マクロファージ内に内因性陽性反応と同等以上の免疫反応が認められる (矢印)。

c, d : PRDX-6陰性例の免疫組織化学。気管支上皮細胞 (矢頭) 近傍の線維性組織内や肺胞マクロファージ内に内因性陽性反応と同等以上の免疫反応は認められない (矢印)。

NCと比較しBLMモデルで有意に低値であり、これまでに報告された他のモデル同様PRDX-6の抑制が肺の線維化進展に関与している可能性が示唆された。また、FSの異なるBLMモデル同士の比較では、線維化がごくわずかにしかみられないマウス (FS 0.25) と比較し、線維化が比較的軽度であるマウス (FS 1.5~2.5) においてPRDX-6は有意に低発現であったものの、線維化が比較的高度にみられるマウス (FS 3.5) では有意差がみられず、PRDX-6の抑制は線維化の初期段階に関与している可能性が考えられた。これまでの報告に、IPF/UIP患者の肺組織において、一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase: NOS) の発

現がIPF/UIPの初期から中期にかけて上昇しており、これに伴う活性酸素であるNOの上昇が肺傷害の進展に関与している可能性を示した報告がある²⁶⁾。レドックスバランスが不均衡となる時期が我々の実験結果に合致しており非常に興味深い。すなわち、活性酸素の増加や抗酸化物質の低下が、線維化の比較的早期に起きている可能性が考えられた。

難治性肺線維性疾患におけるレドックスインバランスに関しては、IPF/UIP患者のBALF中で、酸化ストレスマーカーの一つでありフリーラジカルによって組織リン脂質の非酵素的酸化により生成される8-イソプロスタニンが上昇すること²⁷⁾

表3 難治性肺線維性疾患患者におけるPRDX-6の発現と各種臨床病理学的因子との相関

	合計	PRDX-6		p
		陽性	陰性	
症例数	13	8	5	
年齢 (歳)	62.54 ± 2.21 (50-75)	62.00 ± 2.72 (50-72)	63.40 ± 4.12 (50-75)	0.942 ^b
性別				
男性	8	4	4	
女性	5	4	1	0.565 ^d
総合診断				
IPF/UIP	3	3	0	
fNSIP	9	5	4	
chronic HP	1	0	1	0.164 ^c
喫煙歴				
current smoker	4	3	1	
former smoker	1	1	0	
never smoker	8	4	4	0.501 ^c
KL-6 (U/ml)	1852.23 ± 597.53	2206.00 ± 955.70	1286.20 ± 212.07	0.884 ^b
AaDO ₂ (Torr)	19.91 ± 2.85	16.33 ± 3.29	25.63 ± 4.44	0.107 ^b
%VC (%)	78.00 ± 4.90	83.10 ± 6.80	70.00 ± 5.70	0.188 ^b
%DL _{co} (%)	48.30 ± 4.10	48.90 ± 4.6	44.4 ± 12.4	0.734 ^{ab}
HOT使用歴				
あり	4	4	0	
なし	9	4	5	0.105 ^d
ステロイド・免疫抑制剤使用歴				
あり	12	6	5	
なし	2	2	0	>0.999 ^d

a: 1例は不明

b: Mann-Whitney 検定, c: χ^2 test, d: Fisher の直接確率計算により検定を行った.

fNSIP: fibrotic non-specific interstitial pneumonia, IPF/UIP: idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia, HP: hypersensitivity pneumonitis

や、脂質過酸化の指標としての呼気中エタンが上昇すること²⁸⁾などが報告されている。また、抗酸化作用の低下に関しては、IPF/UIP患者の肺胞上皮被覆液中における抗酸化物質GSHの低下^{29,30)}や、IPF/UIP検体の線維化領域における細胞外スーパーオキシドジスムターゼの低下³¹⁾などが報告されている。しかしながら、ヒトの難治性肺線維性疾患とPRDX-6の関係に言及した報告はこれまでにみられない。文献的に、PRDX-6が電子供与体としてGSHを利用していることや、線維化の進展部位においてGSHが低下していることを勘案すれば、抗酸化作用のあるPRDX-6の低下が肺の線維化に密接に関与している可能性が十分にある。

今回我々は、難治性肺線維性疾患患者のVATS下肺生検組織を用いて、PRDX-6の免疫組織化学的検討を行った。検討し得た13症例のうち、PRDX-6陽性例は8例、PRDX-6陰性例は5例であった。PRDX-6陰性例はPRDX-6陽性例と比較し有意に予後不良であり、またPRDX-6の発現と各種臨床因子は何ら相関を示さず、PRDX-6陰性は独立した予後不良因子である可能性が考えられた。多変量解析では有意な結果が得られなかったものの(未掲載データ)、症例数の不足による影響を除外し得ないため、今後さらに症例を増やして検討を続けたいと考えている。

また今回我々は、難治性肺線維性疾患として

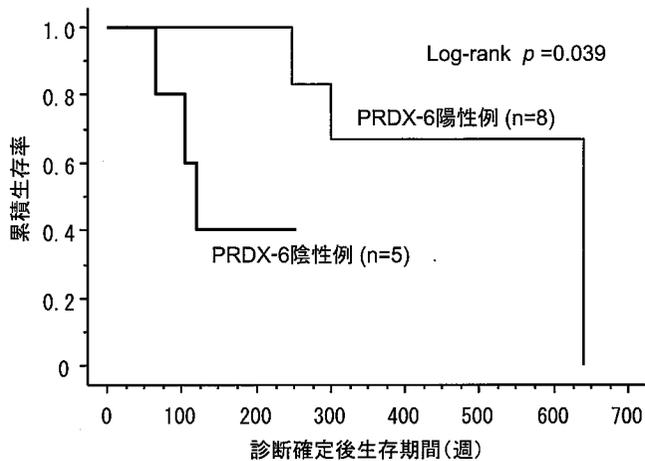


図4 難治性肺線維性疾患におけるKaplan-Meier生存曲線

PRDX-6陽性例 (n = 8) の平均生存期間は334.9週, PRDX-6陰性例 (n = 5) の平均生存期間は155.6週であった. log-rank法による解析の結果, PRDX-6陰性群の予後はPRDX-6陽性群と比較し有意に不良である ($p = 0.039$).

fNSIP, IPF/UIP, chronic HPの3疾患をまとめて検討した. しかしながらそれぞれの疾患において, 線維化に関与する分子は全く同一ではない可能性を否認しない. 今後症例数を増やし, 同一疾患内で同様の検討を行っていく必要があるものと思われた.

近年, 難治性肺線維性疾患に対する治療として, 抗酸化物質の一つであるGSHの前駆物質であり, また直接活性酸素のスカベンジャーとしても作用するとされるN-アセチルシステイン (N-acetylcysteine: NAC) の内服による臨床試験が行われ, 12ヶ月間のVC, DL_{CO}値の低下がプラセボ群と比較し有意に抑制されると報告された³²⁾. しかしながら, 生命予後の改善には至っておらずその効果は限定的である. 難治性肺線維性疾患患者の肺組織において, PRDX-6陽性例と陰性例の生命予後に有意差がみられたという今回の我々の結果からは, PRDX-6の活性化を介したレドックスインバランスの改善は今後の治療戦略の一つになり得るものと考えられる. また上述したように, PRDX-6が線維化の比較的軽度なモデルで低下していたことを勘案すると, 線維化が比較的軽度な段階でPRDX-6を活性化できれば, さらに線維化の抑制効果が高くなるかもしれない. 今後*in vivo*におけるPRDX-6の活性化の検討と, それに

よる線維化抑制効果の検証を行い, 治療法の開発につなげていきたい.

本研究で我々は, 肺疾患領域ではじめてショットガンプロテオーム解析を行い, PRDX-6の抑制状態が肺の線維化に密接に関与している可能性を示した. また難治性肺線維性疾患患者の生検肺組織においてはPRDX-6陰性が予後不良を示唆することを示した. 難治性肺線維性疾患の病態解明と治療戦略において非常に重要な知見であると考えられた.

結 語

難治性肺線維性疾患における肺線維化の進行に, PRDX-6の抑制状態は重要な役割を果たしている可能性がある.

本稿を終えるにあたり, 終始懇切なるご指導とご高閣を賜りました鳥取大学医学部統合内科医学講座分子制御内科学分野 清水英治教授, またご高閣を賜りました鳥取大学医学部器官制御外科学講座麻酔・集中治療医学分野 稲垣喜三教授, 鳥取大学医学部病態解析医学講座統合分子医化学分野 松浦達也教授に深謝致します. また, ご協力を頂きました鳥取大学医学部統合内科医学講座分子制御内科学分野 石川総一郎先生, 他 同分野の諸先生に厚く御礼申し上げます.

文 献

- 1) Raghu G, Collard HR, Egan JJ, 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) American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **165**: 277-304.
- 3) Nicholson AG, Colby TV, du Bois RM, et al. The prognostic significance of the histologic pattern of interstitial pneumonia in patients presenting with the clinical entity of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **162**: 2213-2217.
- 4) Latsi PI, du Bois RM, Nicholson AG, et al. Fibrotic idiopathic interstitial pneumonia: the prognostic value of longitudinal functional trends. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; **168**: 531-537.
- 5) Richerson HB, Bernstein IL, Fink JN, et al. Guidelines for the clinical evaluation of hypersensitivity pneumonitis. Report of the Subcommittee on Hypersensitivity Pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1989; **84**: 839-844.
- 6) Ohtani Y, Saiki S, Kitaichi M, et al. Chronic bird fancier's lung: histopathological and clinical correlation. An application of the 2002 ATS/ERS consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Thorax* 2005; **60**: 665-671.
- 7) Collard HR, Moore BB, Flaherty KR, et al. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **176**: 636-643.
- 8) Churg A, Muller NL, Silva CI, et al. Acute exacerbation (acute lung injury of unknown cause) in UIP and other forms of fibrotic interstitial pneumonias. *Am J Surg Pathol* 2007; **31**: 277-284.
- 9) Miyazaki Y, Tateishi T, Akashi T, et al. Clinical predictors and histologic appearance of acute exacerbations in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2008; **134**: 1265-1270.
- 10) Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2001; **345**: 517-525.
- 11) Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* 2007; **132**: 1311-1321.
- 12) Antoniou KM, Pataka A, Bouros D, et al. Pathogenetic pathways and novel pharmacotherapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther* 2007; **20**: 453-461.
- 13) Wattiez R, Hermans C, Cruyt C, et al. Human bronchoalveolar lavage fluid protein two-dimensional database: study of interstitial lung diseases. *Electrophoresis* 2000; **21**: 2703-2712.
- 14) Rottoli P, Magi B, Perari MG, et al. Cytokine profile and proteome analysis in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics* 2005; **5**: 1423-1430.
- 15) Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 2001; **36**: 1083-1091.
- 16) Zieske LR. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot* 2006; **57**: 1501-1508.
- 17) Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, et al. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *J Biol Chem* 2000; **275**: 28421-28427.
- 18) Wang Y, Phelan SA, Manevich Y, et al. Transgenic mice overexpressing peroxiredoxin 6 show increased resistance to lung injury in hyperoxia. *Am J Respir*

- Cell Mol Biol 2006; **34**: 481-486.
- 19) Yang D, Song Y, Wang X, et al. Deletion of peroxiredoxin 6 potentiates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Crit Care Med* 2011; **39**: 756-764.
 - 20) Harrison JH Jr, Lazo JS. High dose continuous infusion of bleomycin in mice: a new model for drug-induced pulmonary fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; **243**: 1185-1194.
 - 21) Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988; **41**: 467-470.
 - 22) Fisher AB, Dodia C, Manevich Y, et al. Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1999; **274**: 21326-21334.
 - 23) Mo Y, Feinstein SI, Manevich Y, et al. 1-Cys peroxiredoxin knock-out mice express mRNA but not protein for a highly related intronless gene. *FEBS Lett* 2003; **555**: 192-198.
 - 24) Kim TS, Dodia C, Chen X, et al. Cloning and expression of rat lung acidic Ca²⁺-independent PLA₂ and its organ distribution. *Am J Physiol* 1998; **274**: L750-61.
 - 25) Kinnula VL, Lehtonen S, Kaarteenaho-Wiik R, et al. Cell specific expression of peroxiredoxins in human lung and pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 2002; **57**: 157-164.
 - 26) Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **155**: 1763-1769.
 - 27) Montuschi P, Ciabattini G, Paredi P, et al. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **158**: 1524-1527.
 - 28) Kanoh S, Kobayashi H, Motoyoshi K. Exhaled ethane: an in vivo biomarker of lipid peroxidation in interstitial lung diseases. *Chest* 2005; **128**: 2387-2392.
 - 29) Beeh KM, Beier J, Haas IC, et al. Glutathione deficiency of the lower respiratory tract in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2002; **19**: 1119-1123.
 - 30) Hunninghake GW. Antioxidant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2005; **353**: 2285-2287.
 - 31) Kinnula VL, Hodgson UA, Lakari EK, et al. Extracellular superoxide dismutase has a highly specific localization in idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia. *Histopathology* 2006; **49**: 66-74.
 - 32) Demedts M, Behr J, Buhl R, et al. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2005; **353**: 2229-2242.