

福島県立医科大学大学院医学研究科  
博士課程 医学専攻 呼吸器病態学

博士学位論文

(タイトル)

肺の線維化におけるミッドカインの役割の検討

2016 年 5 月

(申請者氏名)

美佐 健一



1.略語.....	1
2.概要.....	2
3.背景.....	4
4.方法.....	7
4-1.IPF 患者の検討.....	7
4-2.ミッドカイン濃度の測定.....	8
4-3.マウス bleomycin 肺線維症モデル.....	9
4-4.肺組織中メディエーターmRNA の測定.....	10
4-5.肺胞洗浄液中の解析.....	11
4-6.肺組織中コラーゲン量の測定.....	12
4-7.組織病理学的な肺線維化の評価.....	12
4-8.統計解析.....	13
5.結果.....	14
5-1.IPF 患者における血清ミッドカイン濃度.....	14
5-2.IPF 患者の血清ミッドカイン濃度と臨床パラメーターとの関連.....	14
5-3.IPF 患者の気管支肺胞洗浄液中ミッドカイン濃度と臨床パラメーターとの関連.....	15
5-4.Bleomycin 気管内投与後のマウス肺組織における ミッドカイン mRNA の発現の変化.....	15
5-5.Bleomycin 肺線維症モデルにおけるミッドカインの役割の検討.....	16
5-5-1.....	16
肺線維化の検討.....	16
5-5-2.気管支肺胞洗浄液の検討.....	17
5-5-3.肺組織中の炎症性メディエーターの検討.....	17
5-5-4.肺組織 TGF- $\beta$ 発現の検討.....	18
6.考察.....	18
7.結語.....	25
8.謝辞.....	25
9.引用文献.....	27
10.図の説明.....	42
11.表.....	47



## 1. 略 語

$\alpha$  - S M A :  $\alpha$  - smooth muscle actin  
A L K : anaplastic lymphoma kinase  
B L M : bleomycin  
D N A : deoxyribonucleic acid  
E L I Z A : enzyme-linked immunoSorbent assay  
E M T : epithelial-mesenchymal transition  
F G F : fibroblast growth factors  
G A P D H : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
I F N -  $\gamma$  : interferon- $\gamma$   
I L : interleukin  
I P F : idiopathic pulmonary fibrosis  
K C : keratinocyte-derived chemokine  
M A P キ ナ ー ゼ : mitogen-activated Protein キ ナ ー ゼ  
M C P - 1 : monocyte chemotactic protein-1  
m R N A : messenger ribonucleic acid  
N I H 3 T 3 : 3 days, transfer, inoculum  $3 \times 10^5$  cells/50mm dish  
P C R : polymerase chain reaction  
P I 3 : phosphoinositide 3-kinase  
R P M I : roswell park memorial institute  
T G F -  $\beta$  : transforming growth factor- $\beta$   
T h - 2 : T helper 2  
T N F -  $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$



## 2. 概 要

特発性肺線維症は，慢性に肺の線維化が進行し，診断時からの平均生存期間が3・5年と予後不良の原因不明難治性肺疾患であるが，その病態は不明な点が多い．

ミッドカインは低分子量ヘパリン結合性蛋白であり，主に発生期中期胚に強く発現し，細胞の成長，生存，移動を促進するなど様々な生理活性を持つ．成体での発現は限局しているが，癌細胞や炎症，修復の過程で強く発現し，様々な疾患の病態に関与していることが報告されているが，肺における役割はよく知られていない．本研究では，特発性肺線維症患者からの臨床検体とマウス bleomycin 肺線維モデルを使用して，ミッドカインの肺線維化における役割を検討した．

特発性肺線維症患者では，血清ミッドカインは健常者と比較して有意に高値であり，血清と気管支肺胞洗浄液中ミッドカイ



ンは気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞比率と正の相関関係が認められた。マウス bleomycin 肺線維化モデルでは、野生型マウスにおいて bleomycin 気管内投与後、肺組織でミッドカインの発現が増強し、ミッドカイン欠損マウスでは野生型マウスと比較して bleomycin 投与 14 日後の肺組織で I 型コラーゲン、 $\alpha$ -SMA の mRNA 発現が低く、肺組織中コラーゲン量も有意に低値であり、更に、病学的肺線維化スコアも低値であった。気管支肺胞洗浄液での検討では、bleomycin 投与 7 日後では差が認められなかったが、14 日後にミッドカイン欠損マウスにおける総細胞数とリンパ球比率が低値であった。

次に、肺線維化に関与しているメディエーターの検討を行ったところ、bleomycin 投与 7 日後の TNF- $\alpha$  と 14 日後の TGF- $\beta$  の mRNA の肺組織での発現がミッドカイン欠損マウスにおいて野生型と比較し有意



に低値であった。

以上の結果から，ミッドカインは肺の線維化において肺への炎症細胞の遊走と  $\text{TNF}\alpha$  や  $\text{TGF}-\beta$  の発現に関与し，肺線維化を促進する作用をもつと考えられる。

### 3. 背景

特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は慢性に肺の線維化が進行する原因不明の難治性肺疾患であり，診断からの平均生存期間が 3-5 年の予後不良な疾患である<sup>1)</sup>。本邦における年間発症率は人口 10 万人対 2.5，有病率 11.0 であり，1 万 3000 人以上が罹患していると推定されている<sup>2)</sup>。肺の線維化のメカニズムは複雑で，様々な細胞が関与しているが，肺線維芽細胞は細胞外基質の産生や筋線維芽細胞への分化などを介し，重要な役割を担っている。しかし，その分子細胞学的な病



態の全容についてはいまだ不明な点が多い。

ミッドカイン (midkine:MK) は 1988 年に発見された分子量約 13000 の低分子量ヘパリン結合性蛋白であり，主に発生期中期胚に上皮間葉相互作用をしている上皮組織や分化中の神経組織，リモデリング中の結合組織などで強く発現し，細胞の成長，生存，移動を促進するなど様々な生理活性を持つ<sup>3-5)</sup>。成体での発現は限局しているが，癌組織<sup>6)</sup>や炎症、修復の過程<sup>7)</sup>で強く発現し，様々な疾患の病態に関与していることが報告されている<sup>8)</sup>。

実際，関節リウマチ患者の関節液中でミッドカインは増加しており，滑膜細胞や毛細血管内皮細胞に発現し好中球の遊走を促進することや<sup>9)</sup>，腎臓の虚血再灌流傷害で，近位尿細管での発現が亢進したミッドカインは，MCP-1などのケモカインの発現亢進を介して腎臓への炎症細胞の遊走に



関与していること<sup>10)</sup>などが報告されており，炎症反応において重要な役割を果たしていることが示唆されている．

肺におけるミッドカインの役割についての報告は少ないが，嚢胞性線維症患者の気道で発現が亢進すること<sup>11)</sup>や緑膿菌や真菌に対して抗菌作用をもつこと<sup>11,12)</sup>などが報告され，肺の炎症においても重要な役割を果たすことが示唆されているが，その詳細は不明である．本研究では，IPF患者からの臨床検体とマウス bleomycin 肺線維症モデルを使用して，ミッドカインの肺線維化における役割を検討した．



## 4. 方 法

### 4-1. IPF 患 者 の 検 討

福島県立医科大学附属病院呼吸器内科で精査，診断した IPF 患者から採取した血清と気管支肺胞洗浄液を用いて検討を行った．血清は採血後の全血を  $4^{\circ}\text{C}$ ， $3500\text{rpm}$  で 10 分間遠心分離し，測定を行うまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した．気管支肺胞洗浄液は検体採取後，細胞分画測定用に洗浄液  $50\mu\text{L}$  を別に残し，残りの洗浄液は  $4^{\circ}\text{C}$   $1500\text{rpm}$  で 10 分間遠心分離し，上清は  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存．沈渣は RPMI-1640 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA)  $2\text{mL}$  を加え攪拌した後 TRY PAN BLUE (Sigma) で染色し，Neubauer 計算盤（ワトソン株式会社，東京，日本）を用いて総細胞数，生存率を計測した．細胞分画用の  $50\mu\text{L}$  と RPMI-1640 medium (Sigma)  $50\mu\text{L}$  を等量混合した 2 倍希釈液  $100\mu\text{L}$  にし，プレパラートカートリッジに入れ， $4^{\circ}\text{C}$   $700\text{rpm}$  で 5



分間遠心分離 ( KUBOTA 2800 ) を行った後  
Diff-Quik 染色を行い , 総細胞数 300 にな  
るまでカウントし分画を計測した . IPF 患  
者の臨床的特徴はカルテ記録を用いて収  
集した . 健常者からの検体は , 同意を得ら  
れた福島県立医科大学職員からの血清を  
用いた .

#### 4・2・ミッドカイン濃度の測定

健常者と IPF 患者の血清および気管支  
肺胞洗浄液中のミッドカイン濃度は  
Human Midkine DuoSet ELISA kit ( R & D  
systems , Minneapolis , MN , USA ) を使用  
して測定した . 抗ヒトミッドカイン抗体を  
固相化した ELISA 用プレート ( Thermo  
Fisher Scientific , Waltham , MA , USA )  
に検体 100  $\mu$ l を加え 2 時間反応させた後 ,  
400  $\mu$ l の wash buffer で 3 回洗浄 . その後 ,  
100  $\mu$ l のビオチン標識した抗ヒトミッドカ  
イン抗体を加え室温で 2 時間反応させ、ス



ト レ プ ト ア ビ ジ ン HRP ( KPL ,  
g a u t h e r s b u r g , M O , U S A ) 100  $\mu$ l を 添 付 し ,  
20 分 間 室 温 で 反 応 さ せ , 洗 浄 後 に  $H_2O_2$  と  
t e t r a m e t h y l b e n z i d i n e の 混 合 試 薬 100  $\mu$ l  
を 追 加 し 発 色 . 20 分 後 に 2 N  $H_2S O_4$  50  $\mu$ l を  
加 え 反 応 停 止 後 , 450 nm で 吸 光 度 を 測 定  
し 検 体 中 の ミ ッ ド カ イ ン 量 を 測 定 し た . こ  
れ ら の 検 討 は 福 島 県 立 医 科 大 学 の 倫 理 委  
員 会 の 承 認 を 得 て 行 っ た .

#### 4・3.マウス bleomycin 肺線維症モデル

ミ ッ ド カ イ ン 欠 損 マ ウ ス ( B 6 ; 1 2 9 - M d k )  
は 名 古 屋 大 学 門 松 健 治 教 授 より 御 供 与 い  
た だ い た . 野 生 型 対 象 群 と し て C 5 7 / B L 6 マ  
ウ ス ( 日 本 チ ャ ー ル ・ リ バ ー ; 日 本 ) を 用 い  
た .

8 ~ 12 週 齢 の 野 生 型 ま た は ミ ッ ド カ イ ン  
欠 損 マ ウ ス に 塩 酸 b l e o m y s i n ( 日 本 化 薬 ,  
日 本 ) 0.8 mg / kg を 気 管 内 投 し 検 討 を 行 っ  
た . 具 体 的 に は , 投 与 前 , ま た は 投 与 7 日 ,

14 日 後 に 十 分 量 の ケ タ ミ ン と キ シ ラ ジ ン  
に よ る 麻 酔 後 , 心 臓 を 直 接 穿 刺 す る こ と に  
よ り 血 液 を 採 取 . そ の 後 に B D イ ン サ イ ト  
オ ー ト ガ ー ド ( B e c t o n , D i c k i n s o n a n d  
C o m p a n y , U S A ) を 気 管 に 挿 入 し て 生 理 食  
塩 水 0.6 m L に よ る 気 管 支 肺 胞 洗 浄 を 計 3  
回 施 行 し た . 洗 浄 液 を 回 収 後 , 摘 出 し た 肺  
組 織 は m R N A の 解 析 に 使 用 し た . ま た , 病  
理 組 織 学 的 検 討 の た め に は , こ れ ま で の 報  
告 し た 方 法 の 通 り <sup>13)</sup> b l e o m y c i n 投 与 14 日  
後 に 10% ホ ル マ リ ン ( 和 光 純 薬 工 業 , 大 阪 ,  
日 本 ) を 気 管 よ り 注 入 し 25 c m H<sub>2</sub>O で 固 定  
し た .

4-4. 肺 組 織 中 メ デ ィ エ ー タ ー m R N A の 測 定  
マ ウ ス 肺 組 織 か ら の R N A 抽 出 は , 氷 上  
で T H - 15 ( O M N I , U S A ) を 用 い て ホ モ ジ ェ  
ネ ー ト し た 後 , A b s o l u t e l y R N A M i n i p r e p  
K i t ( S t r a t a g e n e , L a J o l l a , C A , U S A ) で 行  
っ た . ゲ ノ ム D N A は D N A s e I ( l i f e



technologies, USA)で消化し, RNAは High Capacity cDNA Archive Kit(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて逆転写し, その complementary DNA(cDNA)を定量的 PCR のテンプレートとして用いた.

Power SYBR Green PCR Master Mix 10 $\mu$ l と目的遺伝子の Forward, Reverse の各プライマー (BEX 株式会社, 日本) 0.1 $\mu$ l, および作製した cDNA 2 $\mu$ l と DEPC 処理水 (ナカライ株式会社, 京都, 日本) 7.8 $\mu$ l を PCR 用プレート (Applied Biosystems) で混合し, ABI PRISM 7000(Applied Biosystems)を用いて定量的 PCR を行った. 目的遺伝子は  $\beta$ -action または GAPDH 発現量との比で算出した. 使用したプライマーの配列は表 1 に示す通りである.

#### 4・5. 肺胞洗浄液中の解析

マウス肺胞洗浄液中の蛋白濃度測定に

は BAC Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

#### 4・6. 肺組織中コラーゲン量の測定

肺組織中のコラーゲン量は，Sircol Collagen Assay kit (Biocolor, UK) を用いて測定した。肺組織ホモジェネートを 0.1% ペプシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 加 0.5 M 酢酸 (Sigma-Aldrich) 中で一晚静置後，製品会社のプロトコールに従って測定した。

#### 4・7. 組織病理学的な肺線維化の評価

ホルマリン固定したマウス肺をパラフィン包埋し，厚さ 4  $\mu$ m に薄切しスライドグラスに接着し標本作製後，ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。肺線維化は，これまで報告した通り<sup>13)</sup>，Ashcroft score を用いて評価した。すなわち，0 から 8 までの 9 段階で以下のとおり



採点した。Grade 0：正常肺，grade 1：肺胞や気管支壁の最小限の線維性肥厚，grade 3：明確な肺構造の障害を伴わない中等度の壁肥厚，grade 5：明らかな肺構造の障害と線維帯や小線維塊の形成を伴う線維化，grade 7：重篤な構造破壊と広範な線維化領域，grade 8：領域の完全な線維性閉塞。2奇数間での採点が困難な場合には，中間の偶数で採点した。全ての動物実験は福島県立医科大学動物実験委員会の承認の下で行った。

#### 4・8.統計解析

2群間の比較は，Student's *t*-test あるいは Mann-Whitney U test，多群間の比較は ANOVA を用いた。Post hoc 解析には Fisher's LSD test を用いた。また，相関解析には Pearson correlation coefficient を用いた。全ての解析は統計ソフト IBM SPSS statistics 17.0 (IBM

Japan, Tokyo, Japan) を使用し,  $p < 0.05$  を統計学的有意とした。

## 5. 結果

### 5-1. IPF 患者における血清ミッドカイン濃度

IPF 患者 40 名 (表 2) の血清ミッドカインを健常者 10 名と比較を行ったところ, IPF 患者の血清ミッドカイン濃度は健常者と比較して有意に高値であった (図 1)。

### 5-2. IPF 患者の血清ミッドカイン濃度と臨床パラメーターとの関連

IPF 患者において血清中ミッドカイン濃度が健常者よりも高値であったため, 血清ミッドカインと IPF 患者の臨床検査項目との関連を検討した。血清ミッドカイン濃度は, 血液検査や呼吸機能検査の項目との関連はみられなかったが, 気管支肺胞洗



浄液中の好中球比率と正の相関関係があり，好酸球比率，リンパ球比率割と正の相関傾向があった．

(表 3)

### 5・3・IPF 患者の気管支肺胞洗浄液中ミッドカイン濃度と臨床パラメーターとの関連

IPF 患者の気管支肺胞洗浄液中濃度は  $472.9 \pm 43.3 \text{ pg/ml}$  であり，血清ミッドカイン濃度と正の相関傾向があった ( $r = 0.365$ ,  $p = 0.067$ )．また，血液検査や呼吸機能検査の項目との関連はみられなかったが，気管支肺胞洗浄液中の好酸球比率と正の相関を示し，リンパ球，好中球比率と正の相関傾向があった(表 4)．

### 5・4・Bleomycin 気管内投与後のマウス肺組織におけるミッドカイン mRNA の発現の変化

マウス bleomycin 肺線維症モデルにお

けるミッドカインの役割を検討するために，まず bleomycin 投与後のマウス肺組織におけるミッドカイン mRNA の発現の経時変化を解析した（図 2）．肺組織中ミッドカイン mRNA の発現は，bleomycin 投与後 3 日目に増加するが，その後低下し，14 日目以降に再度徐々に増加した．

#### 5・5・Bleomycin 肺線維症モデルにおけるミッドカインの役割の検討

次に，ミッドカインの肺線維化における役割を検討するために wild type マウスとミッドカイン欠損マウスを使用して，評価を行った．

##### 5・5・1．肺線維化の検討

Bleomycin 投与 14 日後の肺線維化期において，肺組織 I 型コラーゲンと  $\alpha$ -SMA の mRNA はミッドカイン欠損マウスにおいて野生型マウスより発現が低く（図 3），肺組織中コラーゲン量もミッドカイン欠



損マウスで低かった（図 4）。更に，組織病理学的検討においても肺線維化スコアである Ashcroft score が，ミッドカイン欠損マウスにおいて野生型マウスより有意に低値であった（図 5）ことから，ミッドカイン欠損マウスでは bleomycin による肺の線維化が抑制されていることが証明された。

#### 5・5・2．気管支肺胞洗浄液の検討

ミッドカイン欠損マウスにおいて肺の線維化が抑制された機序を明らかにするために bleomycin 投与 7 日と 14 日後の気管支肺胞洗浄液の所見を検討した。

Bleomycin 投与 14 日後に総細胞数とリンパ球比率がミッドカイン欠損マウスで低値であったが（図 6），7 日後では差がみられなかった（図 7）。

#### 5・5・3．肺組織中の炎症性メディエーターの検討

肺組織中の炎症性メディエーターの発

現をミッドカイン欠損マウスと野生型マウスで比較した。7日後において、 $\text{TNF}\alpha$ とKCのmRNA発現がミッドカイン欠損マウスで低下していた(図8)が、7日後のMIP-2、14日後の $\text{TNF}\alpha$  mRNAの発現には差がみられなかった。

#### 5-5-4. 肺組織 $\text{TGF}\cdot\beta$ 発現の検討

次に、肺の線維化に重要な役割をはたしている growth factor である  $\text{TGF}\cdot\beta$  をミッドカイン欠損マウスと野生型マウスで比較した。Bleomycin 投与14日後の肺組織  $\text{TGF}\cdot\beta$  mRNA の発現は、ミッドカイン欠損マウスにおいて野生型マウスと比較して有意に低値であった(図9)。

## 6. 考察

本研究では、IPF患者血清においてミッドカイン濃度が健常者と比較して高値であり、血清と気管支肺胞洗浄液中のミッド



カイン濃度が気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞分画と正の相関関係を示すこと、また、マウス肺組織において bleomycin 投与がミッドカインの発現を亢進させ、ミッドカイン欠損マウスでは bleomycin 投与後の肺の線維化が抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、ミッドカインは肺の線維化の病態に関与し、線維化を増強する作用があることが示された。

IPF は、慢性に肺の線維化が徐々に進行する原因不明の難治性肺線維化疾患であるが、その予後は診断後平均 3-5 年とされ、種々の悪性腫瘍よりも予後不良とも報告されている<sup>14)</sup>。肺線維化進展機序の全容は明らかとなっていない<sup>1)</sup>が、これまでの細胞分子学的解析から、病因、病態に関する研究成果が報告され、徐々に IPF の病態が明らかになりつつあり、最近では、遺伝的因子<sup>15-18)</sup>や粉塵、喫煙などの環境因子<sup>19)</sup>に加え、活性酸素種 (reactive oxygen

species: ROS)<sup>20)</sup>, ウイルス感染<sup>21)</sup>や慢性的な誤嚥, 胃食道逆流症等<sup>22)</sup>などによる肺胞上皮細胞への慢性刺激による傷害を契機とした肺胞上皮細胞のDNA損傷, 過剰なアポトーシスや上皮間葉転換などを介した線維芽細胞の活性化を経て, 線維芽細胞の増殖, 細胞外基質の過剰産生が病態に大きく関与していると考えられている<sup>23-24)</sup>.

本研究ではIPF患者において血清ミッドカインの増加が認められ, 血清と気管支肺胞洗浄液中のミッドカイン濃度が気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞濃度と正の相関関係が認められた. これまでにも, クローン病患者において血清ミッドカイン濃度が上昇し疾患活動性と正の相関関係があること<sup>25)</sup>や, 敗血症患者の血清<sup>26)</sup>や関節リウマチ患者の血清と滑液でミッドカインが増加していること<sup>27)</sup>が報告され, ミッドカインの炎症における重要性が示



唆されている。今回の IPF 患者における結果も肺の炎症におけるミッドカインの重要性を示唆している。

肺の炎症と線維化の関係については種々の議論があるが<sup>30,31)</sup>、IPF や強皮症肺において気管支肺胞洗浄液で好中球などの炎症細胞が増加している場合、予後が不良であることが報告されており<sup>28,29)</sup>、肺の線維化病態にミッドカインが関与していることが示唆される。

また、マウス bleomycin 肺線維症モデルの検討において、bleomycin 気管内投与後にマウス肺組織においてミッドカインの発現上昇が認められた。ミッドカインは、組織障害の場に強く発現していること<sup>9)</sup>がこれまでも報告されており、組織の炎症と修復に重要な役割を果たしていることが示唆されている。本研究においてミッドカイン欠損マウスが野生型マウスと比較して肺の線維化が抑制されていたことは、

ミッドカインが肺の線維化病態において線維化を増強する作用を持つことを示唆しており，これまでのマウス高血糖腎硬化症モデル<sup>32)</sup>や心臓の圧負荷モデル<sup>33)</sup>における結果と合致している．ミッドカイン欠損マウスにおける肺の線維化抑制機序としては，今回の検討からは気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の減少や  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{TGF-}\beta$  といった線維化に関連するメディエーターの発現抑制が関与している可能性がある． $\text{TNF-}\alpha$  は線維芽細胞の増殖と遊走を促進させ<sup>42)</sup>， $\text{TNF-}\alpha$  レセプター欠損マウスでは bleomycin による肺の線維化が抑制されること，アデノウイルスベクターによる  $\text{TNF-}\alpha$  の過剰発現で肺の線維化が増強すること<sup>42)</sup>から， $\text{TNF-}\alpha$  は単なる向炎症性サイトカインではなく線維化促進作用を持つ． $\text{TGF-}\beta$  は，線維芽細胞に対し強力な細胞外基質産生刺激作用と筋線維芽細胞への分化促進作用をもち<sup>47)</sup>，肺胞上皮細胞



胞に対しても apoptosis を誘導することや線維芽細胞への分化を誘導すること（上皮間葉転換）を介して線維化促進作用をもち、肺の線維化における主要な因子のひとつと考えられている。実際、TGF- $\beta$  の活性を制御する  $\alpha v \beta 6$  integrin<sup>48)</sup> や Smad3<sup>49)</sup> の欠損マウでは bleomycin による肺線維化が抑制されることが報告され、ミドカイン欠損マウスにおける肺の線維化抑制にも TGF- $\beta$  の発現低下が関与していると考えられる。

一方、ミッドカイン自体が炎症細胞の遊走活性<sup>9)</sup>、線維芽細胞の増殖促進作用や<sup>41)</sup> コラーゲン、グリコサミノグリカンなどの細胞外基質合成促進作用<sup>42, 43)</sup>、更に上皮間葉転換促進作用をもつことから、ミッドカイン自体が直接肺の線維化に関与している可能性も考えられる。また、最近、Zhang ら<sup>53)</sup> は、肺上皮細胞の過伸展による上皮間葉転換には、Nox1 により発現が増

加したミッドカインと Notch2 の結合，更にその下流の ACE 活性化による angiotensin II の増加が重要であることを示し，ARDS 後の線維化におけるミッドカインの重要性を報告した．これらの結果はミッドカインが肺の線維化病態に深く関与していることを示唆している．

## 7. 結 語

本研究の結果から，ミッドカインは肺線維化を促進する作用をもち，その作用の少なくとも一部は肺への炎症細胞の遊走とTNF- $\alpha$ やTGF- $\beta$ の発現亢進を介していることが示された．肺の線維化病態においてミッドカインの発現を制御することによって，IPFなどの難治性肺線維化疾患の予後を改善できる可能性があり，今後更に検討が必要である．

## 8. 謝 辞

本研究を行うにあたり，御懇篤なるご指導とご高配を賜りました本院呼吸器内科教授，棟方充先に深謝いたします．

ミッドカイン欠損マウスの御提供を賜りました名古屋大学大学院医学系研究科生物化学講座分子生物学教授，門松健治先生



に 深 謝 い た し ま す .

終 始 ご 指 導 と ご 鞭 撻 を 賜 り , 研 究 に 対 す る  
姿 勢 か ら 研 究 方 針 , 論 文 作 製 に 至 る ま で ご  
教 授 頂 き ま し た 当 院 呼 吸 器 内 科 准 教 授 、 谷  
野 功 典 先 生 に 厚 く 感 謝 の 意 を 表 し ま す .

病 理 標 本 作 製 に あ た り 多 大 な ご 支 援 を い  
た だ き ま し た 北 海 道 大 学 大 学 院 医 学 研 究  
科 病 理 学 講 座 講 師 , 谷 野 美 智 枝 先 生 に 厚 く  
感 謝 の 意 を 表 し ま す .

実 験 方 法 を 懇 切 丁 寧 に ご 指 導 い た だ き , 研  
究 に 対 し 常 に 貴 重 な ご 提 言 を い た だ き ま  
し た 当 講 座 特 別 研 究 員 , 王 新 涛 先 生 , 同 助  
教 二 階 堂 雄 文 先 生 , 副 主 任 医 療 技 師 菊 地 正  
美 様 に 厚 く 感 謝 の 意 を 表 し ま す .

本 研 究 を 行 う に 際 し , 貴 重 な 検 体 を ご 提 供  
い た だ き ま し た 患 者 様 方 , 有 形 無 形 の 温 か

いご協力を頂きました当講座の皆様，そして，病床にありながら支えとなってくれた家族に心より感謝の意を表します．

## 9. 引用文献

- 1) American thoracic society:  
Idiopathic pulmonary fibrosis and  
International consensus  
statement. American Thoracic  
Society (ATS), and the European  
Respiratory Society (ERS). Am J  
Respir Crit Care Med 2000;  
161:646-664.
- 2) Natsuizaka M, Chiba H, Kuroshima  
K, et al. Epidemiological Survey of  
Japanese Patients with Idiopathic  
Pulmonary Fibrosis and  
Investigation of Ethnic

Differences. Am J Respir Crit Care Med 2000; 190: 773-779.

- 3) Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 1988;151:1312-1318.
- 4) Matsubara S, Tomomura M, Kadomatsu K, et al. Structure of aretinoic acid-responsive gene, MK, which is transiently activated during the differentiation of embryonal carcinoma cells and the mid-gestation period of mouse embryogenesis. J Bio Chem. 1990;265:9441-9443



- 5) Kadomatsu K, Huang RP, Suganuma T, et al. A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis. *J Cell Biol* 1990;110:607-616.
- 6) Tsutauji J, Kadomatsu K, Matsubara S, et al. A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res*. 1993;53:1281-1285.
- 7) Ohta S, Muramatsu H, Senda T, et al. Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis. *J Bone*

Miner Res. 1999;14:1132-1144

8) Muramatsu T, Midkine and  
pleiotrophin: two related proteins  
involved in development, survival,  
inflammation and tumorigenesis. J  
Biochem 2002;132:359-371.

9) Takada T, Toriyama K, Muramatsu  
H, et al. Midkine, a retinoic acid-  
inducible heparin-binding cytokine  
in inflammatory responses:  
chemotactic activity to neutrophils  
and association with inflammatory  
synovitis. J Biochem. 1997;122:453-  
458.

10) Sato W, Kadomatsu K, Yuzawa Y, et  
al. Midkine is involved in  
neutrophil infiltration into the  
tubulointerstitium in ischemic  
renal injury. J  
Immunol. 2001;167:3463-3469

11) Sara L Nordin, Jovic S, Kurut A, et al. High expression of midkine in the airways of patients with cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2013;49:935-942.

12) Sara L Nordin, Sonesson A, Malmsten M, et al. The epithelium-produced growth factor midkine has fungicidal properties. J Antimicrob Chemother. 2012;67:1927-1936.

13) Tanino Y, Makita H, Miyamoto K, et al. Role of macrophage migration inhibitory factor in bleomycin-induced lung injury and fibrosis in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002 ;283:L156-162.

14) Vancheri C, Failla M, Crimi N, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: a disease with similarities and



links to cancer biology. Eur respire  
J. 2010;35:496-504.

15) Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD,  
et al. Telomerase mutations in  
families with idiopathic pulmonary  
fibrosis. N Engl J  
Med. 2007;356:1317-1356.

16) Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ,  
et al. Adult-onset pulmonary  
fibrosis caused by mutations in  
telomerase. Pros Natl Acad Sci  
USA. 2007;104:7552-7557.

17) Seibold MA, Wise AL, Speer MC, et  
al. A common MUC5B promoter  
polymorphism and pulmonary  
fibrosis. N Engl J  
Med. 2011;364:1503-1512.

18) Fukuhara A, Tanino Y, Ishii T, et  
al. Pulmonary fibrosis in  
dyskeratosis congenita with TINF2

gene mutation. Eur Respir  
J. 2013;42:1757-1759.

19) Baumgartner KB, Samet JM, Stidley  
CA, et al. Cigarette smoking: a  
risk factor for idiopathic  
pulmonary fibrosis. Am J Respir  
Crit Care Med. 1997;155:242-248.

20) Vuokko L. Kinnula, Cheryl L.  
Fattman, Roderick J. Tan, et al.  
Oxidative Stress in Pulmonary  
Fibrosis. Am J Respir Crit Care  
Med. 2005;172: 417-422.

21) Virginia A Folcik, Michela  
Garofalo, Jack Coleman, et al.  
Idiopathic pulmonary fibrosis is  
strongly associated with  
productive infection by  
herpesvirus saimiri. Modern  
Pathology. 2014;27:851-862.

22) Lee JS, Ryu JH, Elicker BM, et al.

- Gastroesophageal Reflux Therapy  
Is Associated with Longer Survival  
in Patients with Idiopathic  
Pulmonary Fibrosis. Am J Respir  
Crit Care Med. 2011;184:1390-1394.
- 23) Noble PW, Barkauskas CE, Jiang D.  
Pulmonary fibrosis: patterns and  
perpetrators. J Clin  
Invest. 2012;122:2756-2762.
- 24) Strieter RM, Mehrad B. New  
mechanisms of pulmonary fibrosis.  
Chest. 2009;136:1364-1370.
- 25) Krzystek-Korpacka M, Neubauer K,  
Matusiewicz M. Circulating  
midkine in Crohn's disease:  
clinical implications. Inflamm  
Bowel Dis. 2010;16:208-215.
- 26) Krzystek-Korpacka M, Mierzchala  
M, Neubauer K, et al. Midkine, a  
multifunctional cytokine, in



patients with severe sepsis and  
septic shock: a pilot study. Shock.  
2011;35:471-477.

27) Maruyama K, Miyamatsu H,  
Ishiguro N, et al. Midkine, a  
heparin-binding growth factor, is  
fundamentally involved in the  
pathogenesis of rheumatoid  
arthritis. Arthritis Rheum.  
2004;50:1420-1429.

28) Heldin P, Laurent TC, Heldin CH,  
et al. Effect of growth factors on  
hyaluronan synthesis in cultured  
human fibroblasts. Biochem  
J. 1989;258:919-922.

29) Itano N, Sawai T, Yoshida M, et  
al. Three isoforms of mammalian  
hyaluronan synthases have distinct  
enzymatic properties. J Biol  
Chem. 1999;274:25085-25092.

- 30) Gross TJ, Hunninghake GW.  
Idiopathic pulmonary fibrosis. N  
Engl J Med. 2001;345:517-525.
- 31) 西岡 安彦 . 特発性間質性肺炎の病  
因・病態 肺線維化の細胞分子病態 .  
日 胸 . 2003;62:S140-S146.
- 32) Kosugi T, Yuzawa Y, Sato W, et al.  
Midkine is involved in  
tubulointerstitial inflammation  
associated with diabetic  
nephropathy. Lab  
Invest. 2007;87:903-913.
- 33) NNetsy S, Shishido T, Kitahara T,  
et al. Midkine exacerbates  
pressure overload-induced cardiac  
remodeling. Biochem Biophys Res  
Commun. 2014;443:205-210.
- 34) Lesur OJ, Mancini NM, Humbert JC,  
et al. Interleukin-6, interferon-  
gamma, and phospholipid levels in



the alveolar lining fluid of human lungs. Profiles in coal worker's pneumoconiosis and idiopathic pulmonary fibrosis. Chest. 1994;106:407-413.

35) Strieter RM, Keane MP. Innate immunity dictates cytokine polarization relevant to the development of pulmonary fibrosis. J Clin Invest. 2004;114:165-168.

36) Boomars KA, Wagenaar SS, Mulder PG, et al. Relationship between cells obtained by bronchoalveolar lavage and survival in idiopathic pulmonary fibrosis. Thorax. 1995;50:1084-1092.

37) Rudd RM, Haslam PL, Turner-Waewick M. Cryptogenic fibrosing alveolitis. Relationship of



pulmonary physiology and  
bronchoalveolar lavage to response  
to treatment and prognosis. Am Rev  
Respir Dis. 1981;124:1-8.

38) A. Xaubet, C. Agusti, P. Luburich,  
et al. Interleukin-8 expression in  
bronchoalveolar lavage cells in the  
evaluation of alveolitis in  
idiopathic pulmonary fibrosis.  
Respir Med. 1998;92:338-344

39) Muramatsu H, Muramatsu T.  
Purification of recombinant  
midkine and examination of its  
biological activities: functional  
comparison of new heparin binding  
factors. Biochem Biophys Res  
Commun. 1991;177:652-658.

40) Sumi Y, Muramatsu H, Hata K, et  
al. Midkine enhances early stages  
of collagen gel contraction. J

Biochem.2000;127:247-251.

41) Kojima S, Muramatsu H, Amanuma H, et al. Midkine Enhances Fibrinolytic Activity of Bovine Endothelial Cells. J Biol Chem.1995;270:9590-9596

42) 岡本竜哉, 菅守隆. 特発性肺線維症 (IPF) の新規治療法の開発: 抗炎症薬から抗線維化薬へ. 日内会誌.2005;94:1075-1081

43) 戸倉猛, 奥久司, 塚本有記. 抗線維化薬ピルフェニドン (ピレスパ®錠 200 mg) の薬理学的特徴と臨床効果. 日薬理誌. 2009;1345:97-104

44) Iwata T, Yoshida S, Nagata K, et al. Experience with perioperative pirfenidone for lung cancer surgery in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Surg Today.2015;45:1263-70

- 45) Schiller M, Javelaud D, Mauviel A.  
TGF-beta-induced SMAD signaling  
and gene regulation: consequences  
for extracellular matrix  
remodeling and wound healing. J  
Dermatol Sci. 2004;35:83-92.
- 46) Marcin Bujak, Nikolaos G  
Frangogiannis. The role of TGF- $\beta$   
signaling in myocardial infarction  
and cardiac remodeling. Cardiovasc  
Res. 2007;74: 184-195
- 47) Willis BC, Borok Z. TGF-beta-  
induced EMT: mechanisms and  
implications for fibrotic lung  
disease. Am J Physiol Lung Cell  
Mol Physiol. 2007;293:L525-534.
- 48) John S Munger, Xiaozhu Huang,  
Hisaski Kawakatsu, et al. A  
Mechanism for Regulating  
Pulmonary Inflammation and



- Fibrosis: The Integrin  $\alpha v \beta 6$  Binds and Activates Latent TGF  $\beta 1$ . *Cell*. 1999;96:319-328.
- 49) Zhao J, Shi W, Wang YL, et al. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:L585-93.
- 50) Schmierer B, Hill CS. TGF $\beta$  SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:970-982.
- 51) Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- $\beta$ -mediated fibrosis. *Nat Commun*. 2012;13:735.
- 52) Huang Y, Hoque MO, Wu F, et al. Midkine induces epithelial-

mesenchymal transition through  
Notch2/Jak2-Stat3 signaling in  
human keratinocytes. Cell  
Cycle. 2008;7:1613-1622

53) Zhang R, et al. Mechanical Stress  
and the Induction of Lung Fibrosis  
via the Midkine Signaling Pathway.  
Am J Respir Crit Care  
Med. 2015;192:315-323

#### 10. 図の説明

Figure 1: Midkine in Serum from Healthy  
Volunteers and Patients with IPF.

IPF 患者 (n=40) では, 健常者 (n=10) と  
比較して血清ミッドカイン濃度が有意に  
低値であった. \* $p < 0.05$  vs 健常者. Mean  
 $\pm$  SEM.

Figure 2: Midkine mRNA Expression in the Lungs after Intratracheal BLM Instillation in Mice.

野生型マウスに経気管的に bleomycin を気管内投与後，肺組織中のミッドカイン mRNA の発現は投与 3 日後で増加，7 日後には減少し，14，21 日後に再度上昇した．

\*  $p < 0.05$  vs day 0. Mean  $\pm$  SEM.

Figure 3: mRNA Expression of Collagen I and  $\alpha$ -SMA in Lung Tissues 14 days after Intratracheal BLM Instillation.

Bleomycin 気管内投与 14 日後の肺組織中 I 型コラーゲンと  $\alpha$  SMA の mRNA 発現は，ミッドカイン欠損マウス ( $n=8$ ) で野生型マウス ( $n=8$ ) と比較して低値であった．

WT: 野生型マウス，*Mdk* KO: ミッドカイン欠損マウス．\*  $p < 0.05$  vs WT. Mean  $\pm$  SEM.

Figure 4: Total Collagen Concentration



in Lung 14 days after Intratracheal  
BLM Instillation.

Bleomycin 気管内投与 14 日後の肺組織中  
コラーゲン量は，野生型マウス ( $n=6$ ) と  
比較して，ミッドカイン欠損マウス ( $n=4$ )  
で有意に低値であった．WT: 野生型マウス，  
*Mdk* KO: ミッドカイン欠損マウス．  
\*  $p < 0.05$  vs WT. Mean  $\pm$  SEM.

Figure 5: Pathological Analysis for  
Lung Fibrosis.

Bleomycin 気管内投与 14 日後のマウス肺  
組織所見．WT: 野生型マウス，*Mdk* KO: ミ  
ッドカイン欠損マウス．ヘマトキシリン・  
エオジン染色．

Figure 6: Analysis of BAL fluid 14 days  
after Intratracheal BLM Instillation.

Bleomycin 気管内投与 14 日後の気管支肺  
胞洗浄液中総細胞数とリンパ球比率は，野

生型マウス (n=17) と比較してミッドカイン欠損マウス (n=19) では有意に低値であった。WT: 野生型マウス, *Mdk* KO: ミッドカイン欠損マウス。Total cell: 総細胞数, Mφ: マクロファージ, Ne: 好中球, Ly: リンパ球。\*p<0.05 vs WT. Mean±SEM.

Figure 7: Analysis of BAL fluid 7 days after Intratracheal BLM Instillation.

Bleomycin 気管内投与 7 日後の気管支肺胞洗浄液所見では, 野生型マウス (n=21) とミッドカイン欠損マウス (n=19) では差を認めなかった。WT: 野生型マウス, *Mdk* KO: ミッドカイン欠損マウス。Total cell: 総細胞数, Mφ: マクロファージ, Ne: 好中球, Ly: リンパ球。Mean±SEM.

Figure 8: mRNA Expression of Inflammatory Cytokines in Lung Tissues 7 days and 14 days after Intratracheal

## BLM Instillation.

Bleomycin 気管内投与 7 日後の肺組織中  $\text{TNF}\alpha$  (a) と KC(b) の mRNA 発現は野生型マウス ( $n=10$ ) と比較して, ミッドカイン欠損マウス ( $n=9-10$ ) で発現が低かったが, MIP-2(c) と 14 日後の  $\text{TNF}\alpha$  (d) の mRNA の発現は差がみられなかった. WT: 野生型マウス, *Mdk* KO: ミッドカイン欠損マウス \* $p<0.05$  vs WT. Mean  $\pm$  SEM.

## Figure 9: mRNA Expression of TGF- $\beta$ in Lung Tissues 14 days after Intratracheal BLM Instillation.

Bleomycin 気管内投与 14 日後の肺組織中 TGF- $\beta$  mRNA の発現は, 野生型マウス ( $n=7$ ) と比較して, ミッドカイン欠損マウス ( $n=8$ ) で有意に低値であった. WT: 野生型マウス, *Mdk* KO: ミッドカイン欠損マウス \* $p<0.05$  vs WT. Mean  $\pm$  SEM.



11. 表

Table 1. The sequences of the primers

Midkine	(F): 5' - CTCGCCCTTCTTGCCCTCTT - 3' (R): 5' - GCAGGGGCACCTTGCAATGGA - 3'
TNF- $\alpha$	(F): 5' - GACCCTCACACTCAGATCATCTTC - 3' (R): 5' - CGCTGGCTCAGCCACTCC - 3'
KC	(F): 5' - GCTCGCTTCTCTGTGTCAG - 3' (R): 5' - GGAGCTTTCAGGGTCAAGG - 3'
MIP-2	(F): 5' - AAGTCATAGCCACTCTCAGG - 3' (R): 5' - AGCGAGGGCACATCAGGTAC - 3'
Collagen I	(F): 5' - TGTTGGCCCATCTGGTAAAGA - 3' (R): 5' - CAGGGAATCCGATGTTGCC - 3'
$\alpha$ -SMA	(F): 5' - CTGCCGAGCGTGAGATTG - 3' (R): 5' - ATAGGTGGTTTTCGTGGATGC - 3'
TGF- $\beta$	(F): 5' - CTGCCGAGCGTGAGATTG - 3' (R): 5' - ATAGGTGGTTTTCGTGGATGC - 3'
Bactin	(F): 5' - CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT - 3' (R): 5' - CGTCACACTTCATGATGGAATTGA - 3'
GAPDH	(F): 5' - CATGGTCTACATGTTCCAGT - 3' (R): 5' - GGCTAAGCAGTTGGTGGTGC - 3'

( F ) : f o r w a r d , ( R ) : r e v e r s e

Table 2. Clinical Characteristics of Healthy Volunteers and Patients with idiopathic pulmonary fibrosis.

	Healthy volunteers	IPF
Subjects (n)	10	40
Age (yrs)	32.6 ± 2.4	69.5 ± 1.1
Gender (M/F)	4/6	34/6
WBC (/μL)	N/A	7590 ± 491
LDH (U/ml)	N/A	237 ± 10
CRP (mg/dl)	N/A	0.6 ± 0.2
ESR (mm/hr)	N/A	20 ± 3
KL-6 (U/ml)	N/A	1251 ± 111
SP-A (ng/ml)	N/A	107.2 ± 13.5
SP-D (ng/ml)	N/A	241.2 ± 26.8
P/F (torr)	N/A	405.1 ± 11.8

IPF: idiopathic pulmonary fibrosis, M: Male, F: female, WBC: white blood cell, LDH: lactate dehydrogenase, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation ratio, KL-6: Krebs von den Lungen-6, SP-A: surfactant protein-A, SP-D: surfactant protein-D, P/F: partial pressure of arterial oxygen/inspired oxygen fraction, N/A: not available.



Table 3. Correlation between Serum Midkine and Clinical Parameters in Patients with idiopathic pulmonary fibrosis

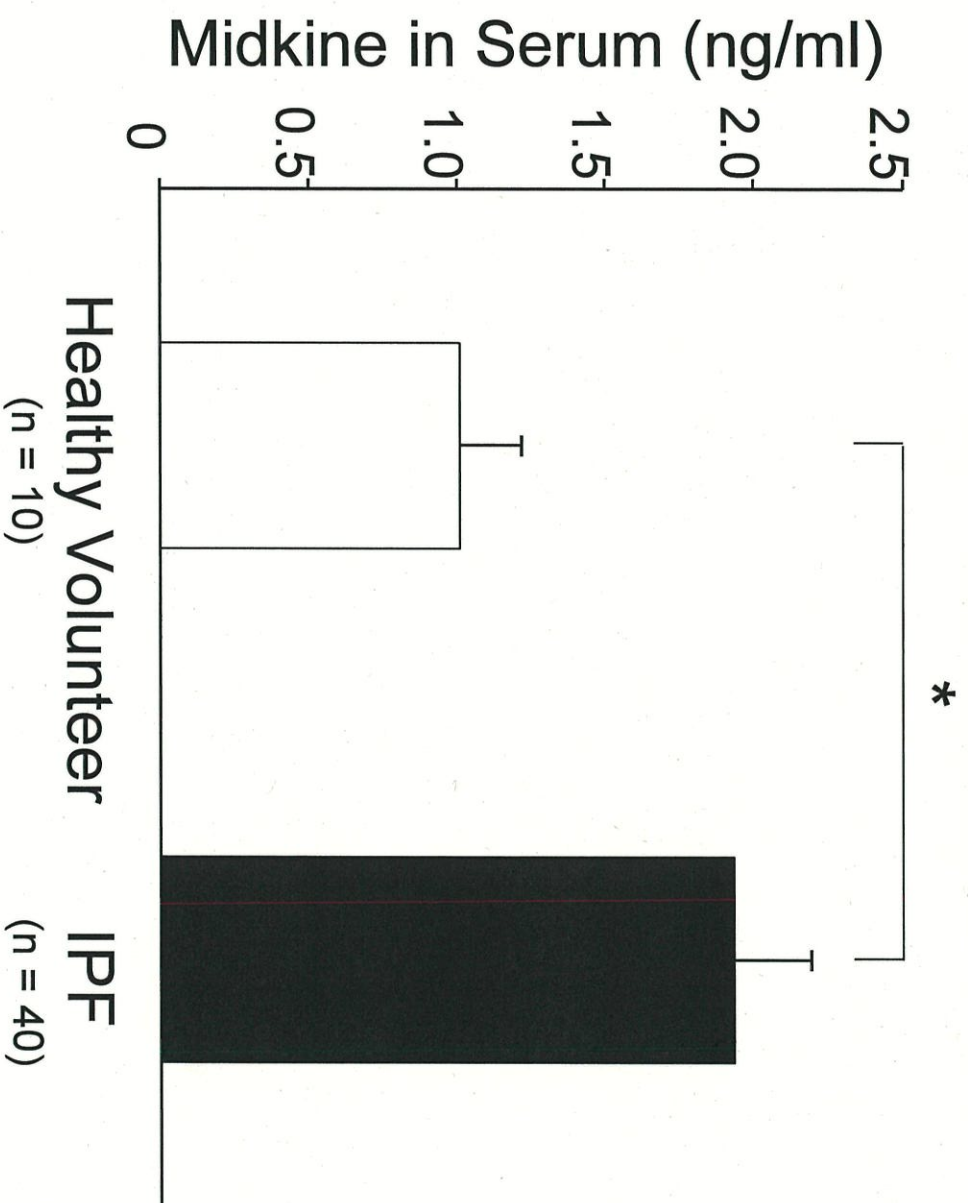
	Correlation coefficients	P value
WBC (/pl)	-0.010	0.960
LDH (mg/dl)	0.313	0.105
CRP (mg/dl)	0.279	0.151
ESR (mm/hr)	0.203	0.300
KL-6 (U/ml)	0.003	0.988
SP-A (ng/ml)	-0.013	0.948
SP-D (ng/ml)	0.040	0.838
P/F (torr)	0.088	0.655
Lym in BALF (%)	0.351	0.079
Neu in BALF (%)	0.481	0.013
Eos in BALF (%)	0.368	0.065
%VC (%)	0.076	0.701

WBC: white blood cell, LDH: lactate dehydrogenase, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation ration, KL-6: Krebs von den Lungen-6, SP-A: surfactant protein-A, SP-D: surfactant protein-D, P/F: partial pressure of arterial oxygen/ inspired oxygen fraction, Lym: lymphocyte, Neu: neutrocyte, Eos: eosinophil, BALF: bronchoalveolar lavage fluid, VC: vital capacity.

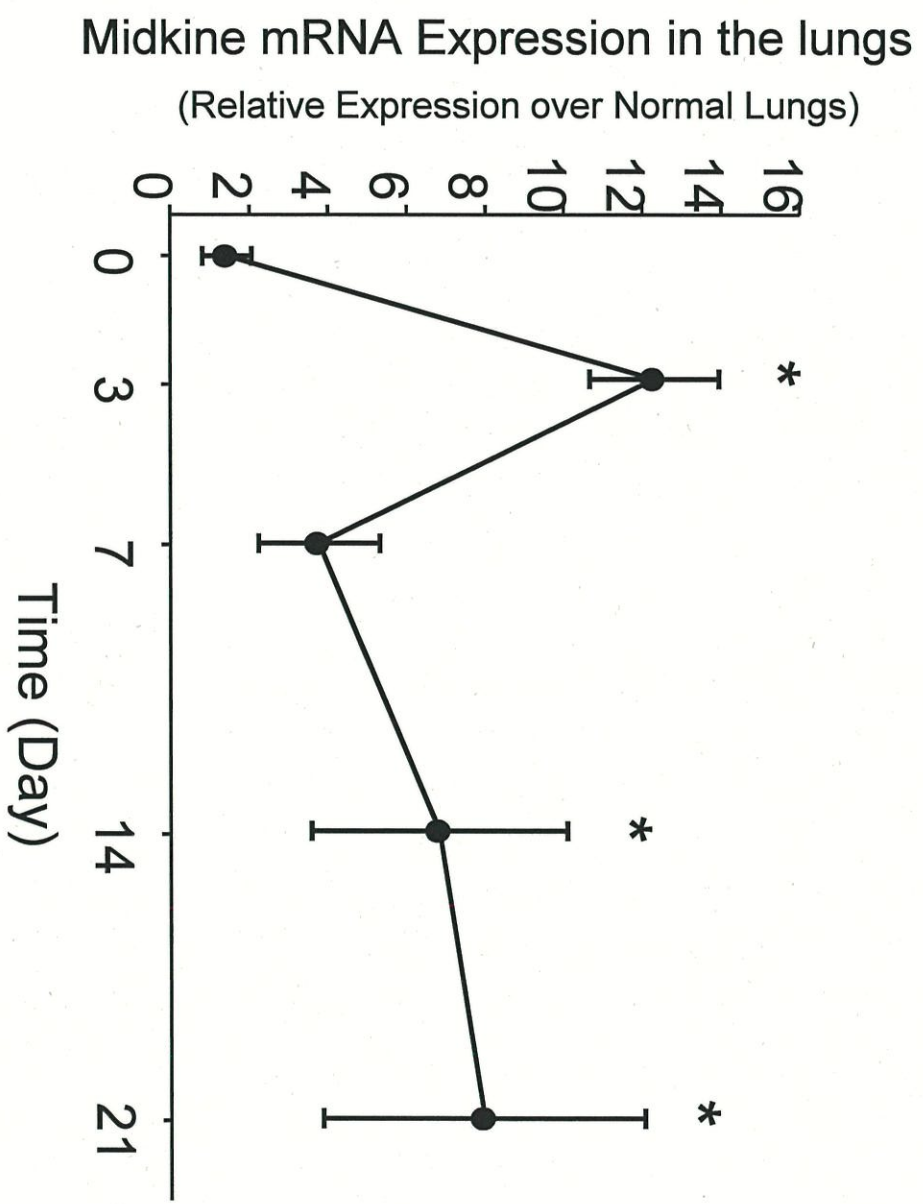
Table 4. Correlation between Midkine in BAL fluid and Clinical Parameters in Patients with idiopathic pulmonary fibrosis

	Correlation coefficients	P value
Lym in BALF (%)	0.292	0.080
Neu in BALF (%)	0.274	0.101
Eos in BALF (%)	0.383	0.019
%VC (%)	0.017	0.922

Lym: lymphocyte, Neu: neutrocyte, Eos: eosinophil, BALF: bronchoalveolar lavage fluid, %VC: vital capacity



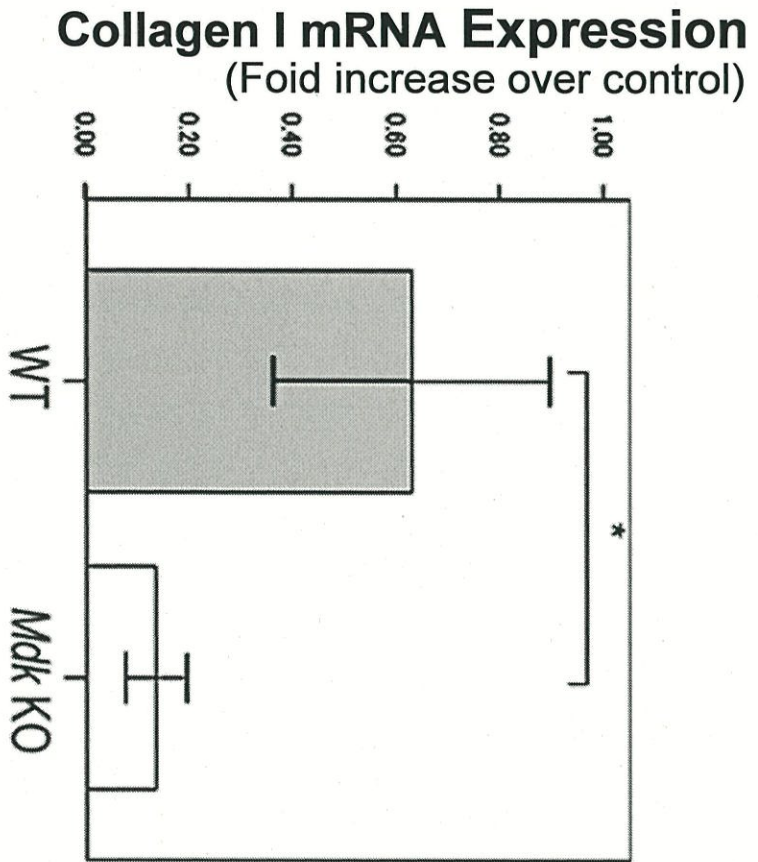
**Figure1. Midkine in Serum from Healthy Volunteers and Patients with IPF.**



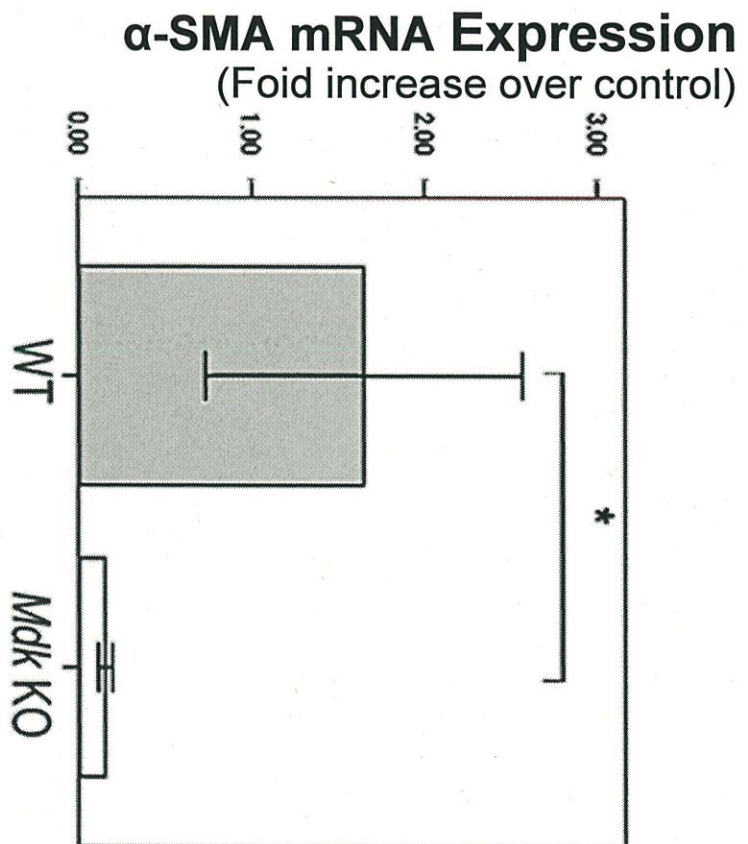
**Figure 2. Midkine mRNA Expression in the Lungs after Intratracheal BLM Instillation in Mice.**



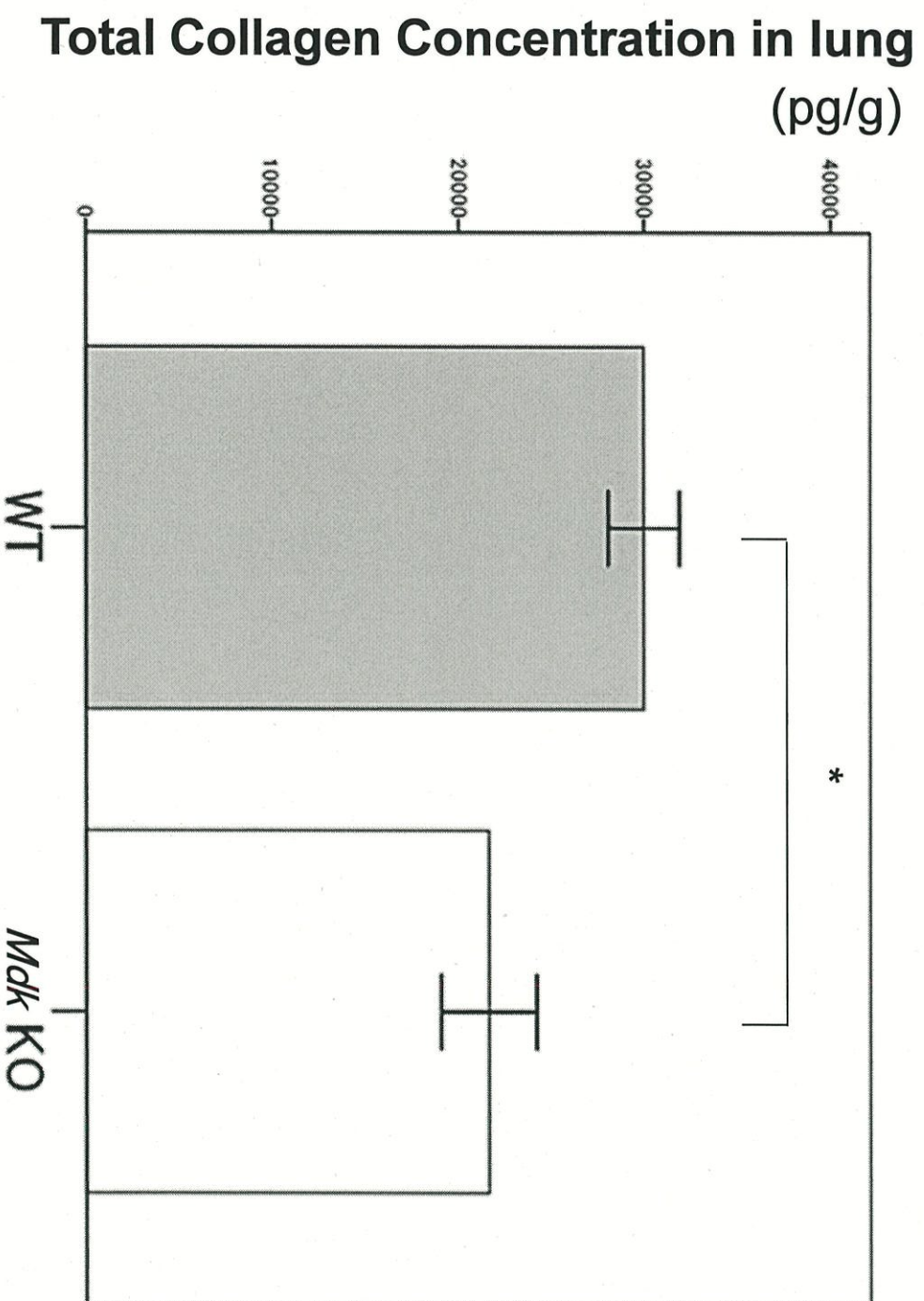
a)



b)

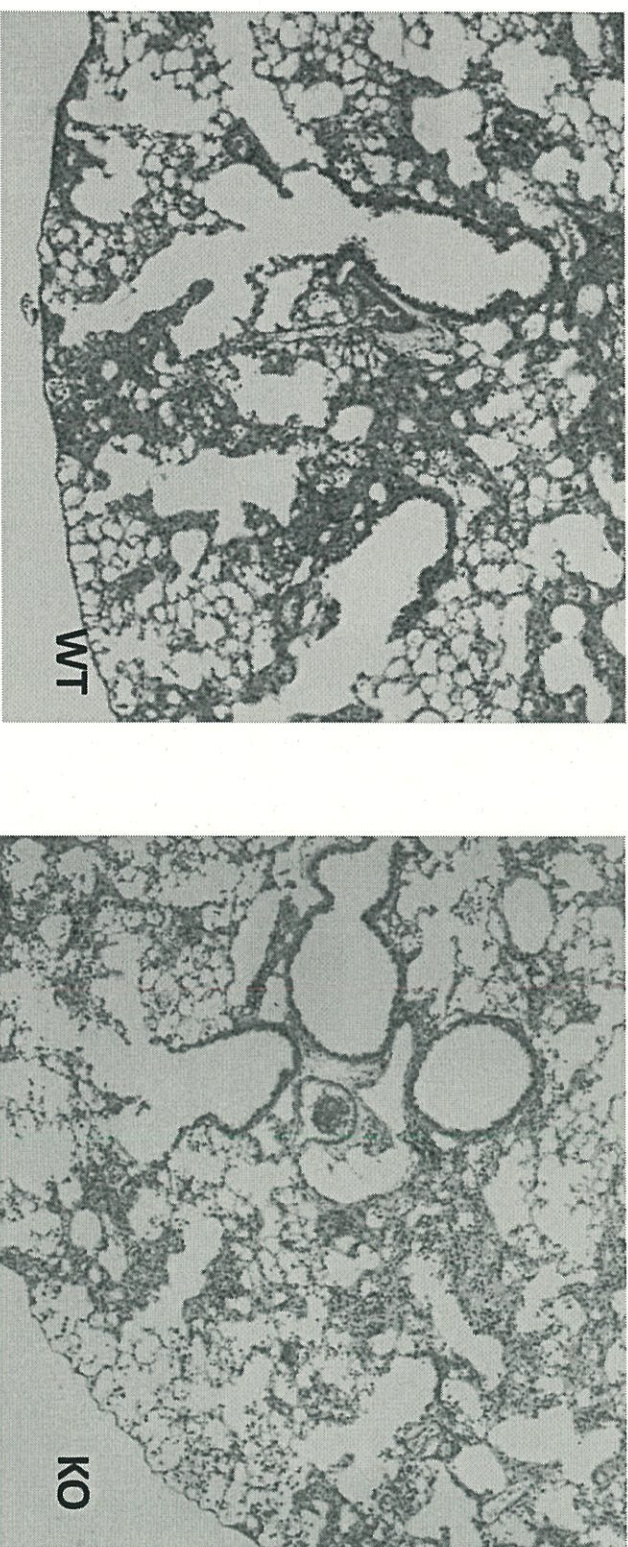


**Figure 3. mRNA Expression of Collagen I and  $\alpha$ -SMA in Lung Tissues 14 days after Intratracheal BLM Instillation.**



**Figure 4. Total Collagen Concentration in Lung 14 days after Intratracheal BLM Instillation**





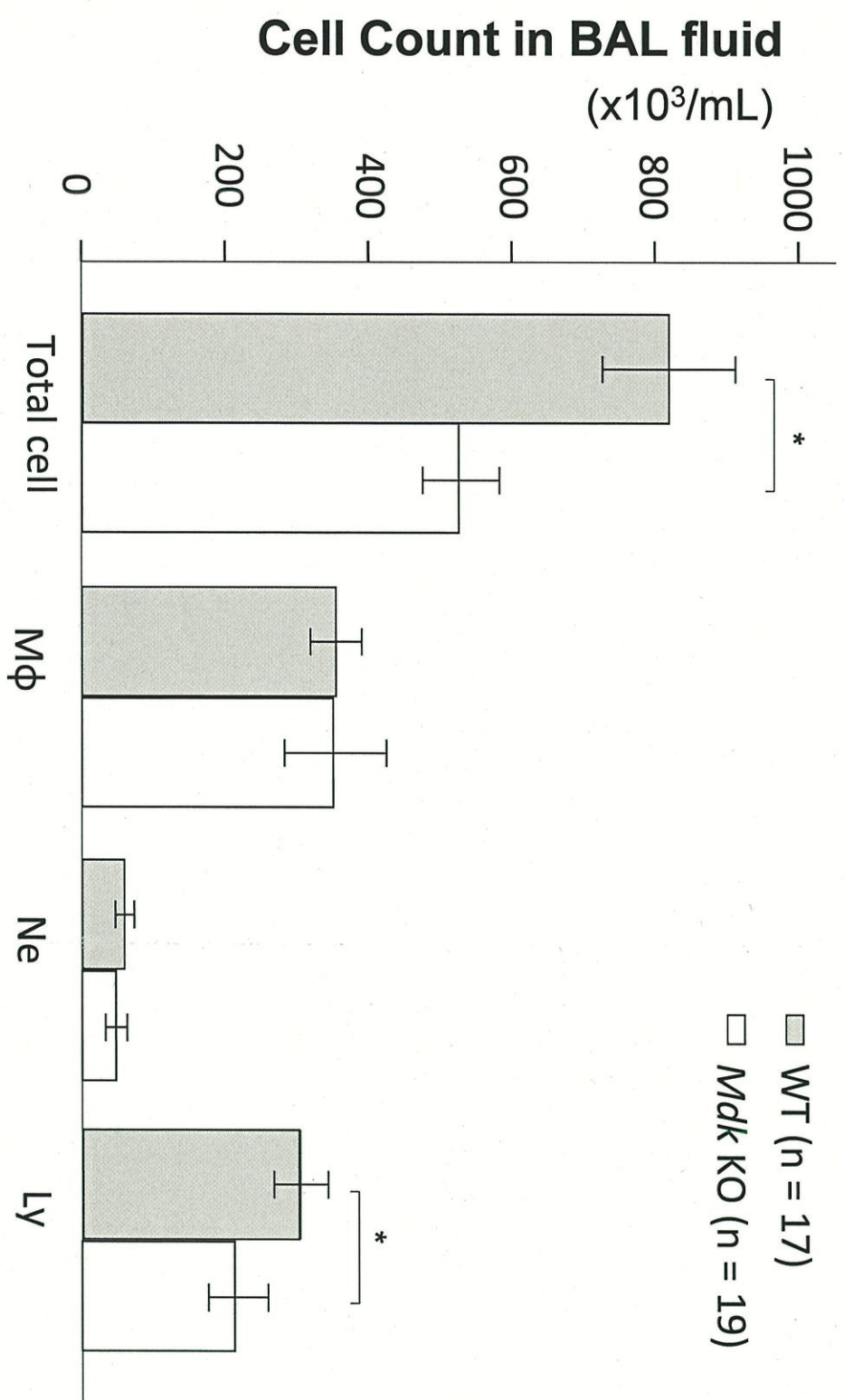
Pathological fibrosis score (Ashcroft score)

Phenotype	n	Ashcroft score
Wild type (WT)	9	4.13 ± 0.41
midkine deficient (KO)	9	3.00 ± 0.12

p<0.05

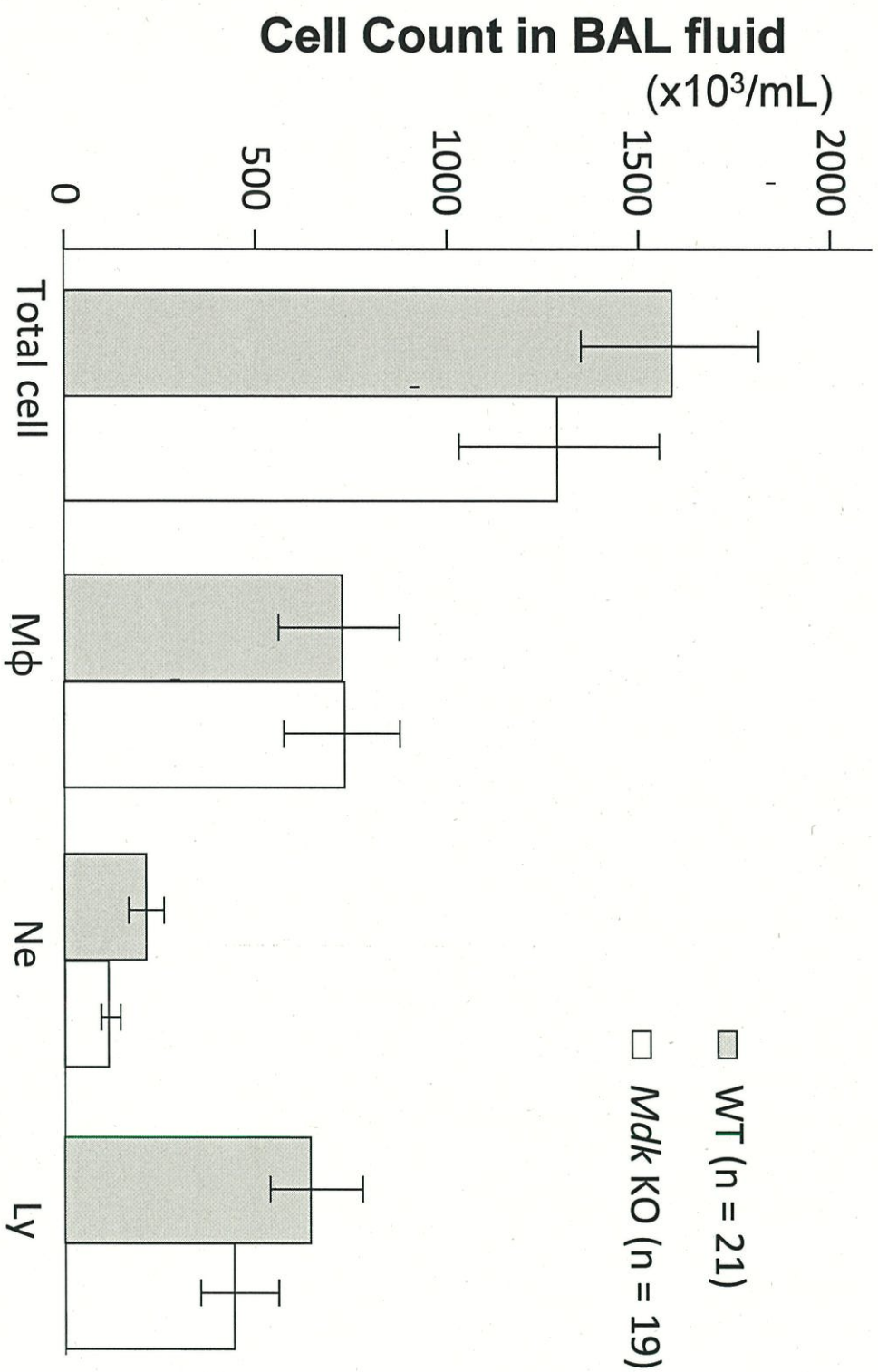
Mean ± SEM

Figure 5. Pathological Analysis  
for Lung Fibrosis

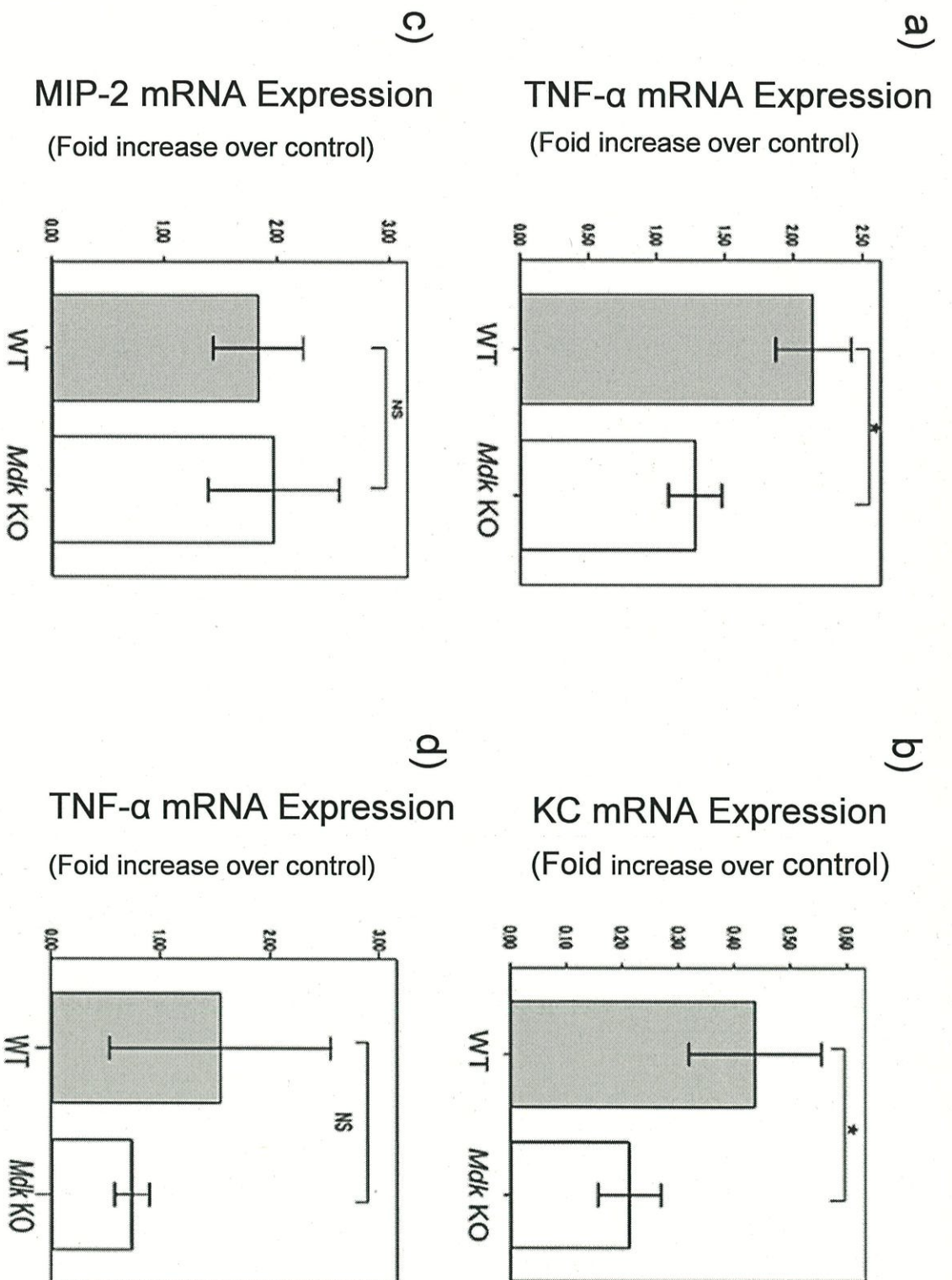


**Figure 6. Analysis of BAL fluid 14 days after Intratracheal BLM Instillation.**

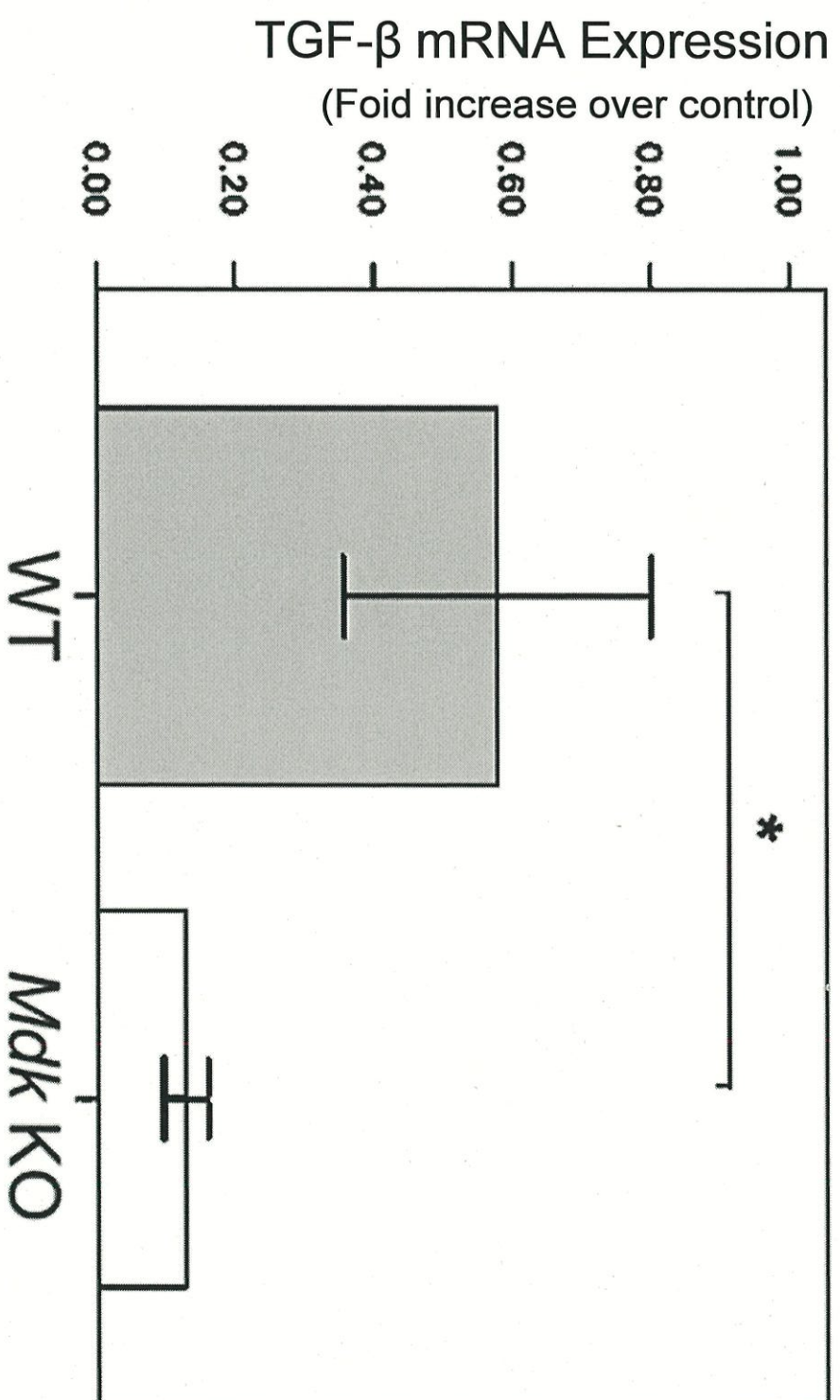




**Figure 7. Analysis of BAL fluid 7 days after Intratracheal BLM Instillation.**



**Figure 8. mRNA Expression of Inflammatory Cytokines in Lung Tissues 7 days and 14 days after Intratracheal BLM Instillation.**



**Figure 9. mRNA Expression of TGF- $\beta$  in Lung Tissues 14 days after Intratracheal BLM Instillation.**