

表 題 mTOR 阻害薬による間質性肺疾患の機序解明

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 鷲野 聡

担当指導教員氏名 森田 辰男 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系 専攻  
腎尿路疾患学 分野  
泌尿性器病態学

2015年1月9日申請の学位論文

## 目次

第1章 序論	3
第2章 実験材料および方法	
第1節 試薬調製	5
第2節 実験動物	5
第3節 肺障害モデルマウスの作製	5
第4節:気管支肺胞洗浄	6
第5節:EBD 肺血管透過性実験	6
第6節:組織学的評価	6
第7節:脂質の抽出と分析	7
第8節:RNA の抽出と real-time quantitative PCR 法	7
第9節:肺粗抽出液の抽出と ELISA 法	8
第10節:肺胞マクロファージの分離	9
第11節:培養細胞実験	9
第12節:統計解析	11
第3章 実験結果	
第1節:肺の組織学的変化の検討	12
第2節:肺血管透過性の変化と炎症細胞浸潤の検討	13
第3節:肺胞腔内および肺胞マクロファージ内への脂質蓄積の検討	14
第4節:肺組織および気管支肺胞洗浄細胞における炎症性サイトカイン発現の検討	16
第5節:血清中の脂質成分の検討	18
第6節:マクロファージの脂質代謝機能に及ぼす影響の検討	19

第7節：テムシロリムスの肺胞マクロファージ数に及ぼす影響の検討	20
第8節：肺胞マクロファージ・肺胞上皮細胞に対するテムシロリムスの細胞傷害性の検討	21
第4章 考察	24
第5章 総括	28
第6章 参考文献	29
第7章 謝辞	35

## 第1章 序論

mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害薬は、細胞の生存・成長・増殖を調節する mTOR の活性を阻害し、細胞周期の進行及び血管新生を抑制することにより腫瘍細胞の増殖を抑制する<sup>(1)</sup>。mTOR 阻害薬であるシロリムスとエベロリムスは、臓器移植後の免疫抑制剤や冠動脈ステントの再狭窄防止剤として用いられている。もう一つの mTOR 阻害薬であるテムシロリムスは、それまで薬物治療を受けていない進行性腎細胞癌症例を対象とした海外第3相臨床試験によって、有効性と安全性が示されている<sup>(2)</sup>。また、エベロリムスは、前治療中に進行した転移性腎細胞癌症例を対象に実施した第3相試験によって有効性と安全性が示されている<sup>(3)</sup>。日本では、2010年1月より進行性腎細胞癌の治療薬としてエベロリムスの使用が可能となり、2010年9月より同疾患に対するテムシロリムスの使用が可能となった。エベロリムスは、進行性乳癌、進行性膵神経内分泌腫瘍、結節性硬化症による上衣下巨細胞性星細胞腫や腎血管筋脂肪腫に対しても、有効性と安全性が第3相試験で検討され、日本や欧米で適応が拡大されてきている<sup>(4-7)</sup>。このように、mTOR 阻害薬は進行性腎細胞癌を含む多くの症例に使用されるようになってきている。

これまでの国内外の臨床試験によって、mTOR 阻害薬投与により、高頻度に間質性肺疾患が発現することが報告されている。日本も参加した腎細胞癌を対象とした国際共同第2相臨床試験では、テムシロリムスによる間質性肺疾患が82例中14例(17.1%)に認められ、前述の海外第3相臨床試験では、エベロリムスを投与された274例中37例(13.5%)が間質性肺疾患と診断された<sup>(1, 2)</sup>。

mTOR 阻害薬による間質性肺疾患の病理学的所見としては、bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP)、リンパ球性間質性肺炎、肉芽腫性肺疾患、肺泡出血などさまざまなパターンが報告されているが、中でも BOOP の報告が多い<sup>(8-11)</sup>。また、気管支肺泡洗浄液の所見としては、ヘルパーT細胞の増加が多く報告されている<sup>(10, 12)</sup>。mTOR 阻害薬による間質性肺疾患の臨床病理学的所見やグルコルチコイドへの良好な反応性より、その発症に免疫学的機序の関与が示唆される<sup>(1)</sup>。また、BOOP の病理学的所見の特徴は、肺泡や間質への泡沫状マクロファージや単核球の浸潤を伴う細気管支における肉芽形成であるが、泡沫状マクロファージはリポイド肺炎や肉芽腫性肺疾患でも認められる所見であり、肺における脂質代謝障害や phagocyte の機能異常も mTOR 阻害薬による間質性肺疾患の発症に関与している可能性がある<sup>(13-15)</sup>。しかし、mTOR 阻害薬による間質性肺疾患の発症機

序は未だ明らかではなく、機序解明を目的とした動物実験や培養細胞実験の報告もほとんどない。

本研究では、テムシロリムスを反復腹腔内投与することにより肺障害モデルマウスを作製し、このモデルマウスを用いて間質性肺疾患の発症機序を検討した。さらに、その詳細な機序を解明するため、培養細胞を用いた検討を行った。

## 第2章 実験材料および方法

### 第1節 試薬調製

テムシロリムスは、Pfizer 社より提供された原末を使用した。テムシロリムス原末を100%エタノールで 30 mg/mL の濃度となるよう溶解し、テムシロリムス保存溶液とし、使用まで-20℃で保存した。実験動物にテムシロリムスを投与する時には、テムシロリムス保存溶液を 5% Tween 80+5% polyethylene glycol の溶媒で 0.1 mg/mL および 1 mg/mL の濃度に希釈し、使用した。

### 第2節 実験動物

6 週齢の雄性 ICR マウスを、日本エスエルシー株式会社より購入した。実験動物は 12 時間の明暗周期下（明期：7 時～19 時、暗期：19 時～7 時、SPF 環境下）にて標準固形資料（CE-2：日本クレア）・滅菌水道水を自由摂食・自由飲水させ飼育した。1 週間の馴化飼育後、自治医科大学動物実験指針に従って実験に使用した。

### 第3節 肺障害モデルマウスの作製

7 週齢の ICR マウスにテムシロリムス 1 mg/kg/日（低用量群）、10 mg/kg/日（高用量群）、もしくは、vehicle を週 3 回腹腔内投与し、4、8 もしくは 12 週間継続した。この動物モデルにおけるテムシロリムスの投与量は、腎癌患者において推奨されるテムシロリムスの投与量（25 mg/body・静脈内投与・1 回/週）よりも多いが、これは次の事項を参考にして決定した：①マウスを用いた動物実験において、テムシロリムスは 3～100 mg/kg/日の投与量で抗腫瘍効果や血液毒性を発揮する<sup>(16, 17)</sup>。②Pfizer 社の社内データを参照すると、マウスにテムシロリムス 1 mg/kg を単回静脈内投与すると血漿中のテムシロリムスおよびシロリムスの areas under curves（AUC）が、1460 ng・h/mL および 2470 ng・h/mL となり、これは腎癌患者において推奨されている投与量であるテムシロリムス 25mg を静脈内投与した際のテムシロリムスおよびシロリムスの AUC（1349 ng・h/mL および 3793 ng・h/mL）

と近似している。薬物投与終了時には、実験動物をペントバルビタール（120 mg/kg）腹腔内投与による麻酔後に失血死させ、サンプルを摘出した。

#### 第4節：気管支肺胞洗浄

22 ゲージのサーフロ針（テルモ社）にて頭側から気管を穿刺し、1 mL の PBS を注入後に吸引し、気管支肺胞洗浄液を採取した。これを計 5 回同様に繰り返した。採取した洗浄液から 1mL を細胞数および細胞分画の検討に用いた。細胞数の算出は、trypan blue 染色液を用いて 1 : 1 で混合・懸濁後、血球計算盤で施行した。また、細胞分画の算出のために、洗浄液を遠心塗沫器にてスライドグラスに展開後、Diff-Quick 染色液（Sysmex 社）で染色した。また、遠心塗沫器にて展開された気管支肺胞洗浄細胞を Oil-red O 染色し、細胞内の neutral lipid 蓄積の有無を検討した。それぞれのスライドあたり 200 個以上の細胞を検鏡・評価し、細胞分画および Oil-red O 染色陽性細胞の割合を算出した。また、洗浄液の一部を 4℃、1500 回転で 10 分間遠心分離し、上清を抽出後 -80℃ で保存した。上清中の総タンパク濃度を BCA protein assay kits（Thermo Scientific 社）を用いて測定した。

#### 第5節：EBD 肺血管透過性実験

Evans blue dye（EBD）を用いて肺血管透過性を評価した。EBD 20 mg/kg を尾静脈より静脈内投与した。1 時間後、実験動物を麻酔後に失血死させ、右心房より 3 mL の PBS を注入し、肺血管中の EBD を除去した。肺を摘出し、液体窒素で凍結した。凍結した肺に 2 mL の PBS を添加後ホモジェネートし、そこに 4 mL の formamide を添加し、攪拌後に 70℃ で 24 時間静置した。その後、5000 g で 30 分間遠心分離し、上清を採取した。上清の吸光度（620 nm、740 nm）を測定した。肺組織中のヘム色素のコンタミネーションを補正し、適切な光学密度（補正  $E_{620}$ ）を算出するために下記計算式を用いた。補正  $E_{620} = E_{620} - (1.426 \times E_{740} + 0.030)$ 。肺組織中の EBD 量は、補正  $E_{620}$  を EBD 投与量で割り算出した。

#### 第6節：組織学的評価

22 ゲージのサーフロ針（テルモ社）で頭側から気管を穿刺し、気管内に 1.5 mL の 10% 中性緩衝ホルマリン液を注入し、肺を摘出した。10% 中性緩衝ホルマリン液中で肺組織を

24 時間固定した後に、パラフィン包埋を行った。パラフィン包埋された肺組織を 5  $\mu\text{m}$  厚にスライスし、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施行した。また、肺組織の F4/80 免疫染色も施行した。5  $\mu\text{m}$  厚にスライスされた組織を脱パラフィン化し、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のプロテイナーゼ K で 3 分間抗原賦活化し、0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、avidin/biotin blocking solution、serum-free protein block (DAKO 社) を用いて、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。1 次抗体の F4/80 抗体 (Serotec 社、1:50) を添加して、室温で一晩静置し、翌日、0.1% tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄した後に 2 次抗体の biotinylated rabbit anti-rat IgG (Vector 社、1:100) を添加して、30 分間室温で静置した。avidin-biotin immunoperoxidase 法と 3,3'-diaminobenzidine を用いて発色し、methyl green (3%) で対比染色した。

## 第 7 節：脂質の抽出と分析

気管支肺胞洗浄細胞および気管支肺胞洗浄液上清より総脂質を抽出した。気管支肺胞洗浄細胞および 1.5 mL 気管支肺胞洗浄液上清にクロロフォルム・メタノール・1M 塩化ナトリウム溶液 (2:1:1.25、vol/vol/vol) をそれぞれ 425  $\mu\text{L}$  および 3.2 mL 混和・攪拌し、1500 回転で 5 分遠心分離後、有機層を抽出した。10% triton X 含有クロロフォルムを添加し、窒素ガスで有機液を揮発除去し、 $\text{H}_2\text{O}$  を添加し懸濁した。懸濁液中の総コレステロール・リン脂質・中性脂肪をそれぞれの測定キット (シスメックス社・和光社・清水メディカル社) を用いて測定した。

## 第 8 節：RNA の抽出と real-time quantitative PCR 法

肺組織および気管支肺胞洗浄細胞より RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) を用いてプロトコールに従って抽出した。抽出 RNA 濃度は分光光度計 NanoDrop 1000 (Thermo Scientific 社) を用いて測定した。逆転写は PrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ社) を用いて施行した。RNA 50–500  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$  に対して、PrimeScript Buffer 2  $\mu\text{L}$ 、PrimeScript RT enzyme Mix I 0.5  $\mu\text{L}$ 、Oligo dT primer 0.5  $\mu\text{L}$ 、Random hexamer 2  $\mu\text{L}$  を添加し、37°C で 15 分反応させた。その後 85°C で 5 秒静置し逆転写反応を停止させ、使用まで -20°C で保存した。Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR system と TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies 社) を用いて real-time quantitative PCR を施行した。合成した cDNA を 1.6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  となるように希釈した。希釈した cDNA 9  $\mu\text{L}$  に Gene



Expression Assay 1  $\mu$ L と PCR master mix (Life Technologies 社) 10  $\mu$ L を混和し、Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR system で real-time quantitative PCR を施行した。内因性コントロールとして GAPDH もしくは  $\beta$ -actin を用い、comparative threshold cycle 法でデータ分析した。今回の検討で使用した TaqMan Gene Expression Assays の GenBank accession numbers と assay identifications は下記の通りである。

- colony stimulating factor (CSF)-1, NM\_001113529.1 • Mm00432686\_m1
- chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), NM\_011333.3 • Mm00441242\_m1
- TNF- $\alpha$ , NM\_013693.2 • Mm00443258\_m1
- IL-6, NM\_031168.1 • Mm00446190\_m1
- CSF-2, NM\_009969.4 • Mm01290062\_m1
- IL-1 $\beta$ , NM\_008361.3 • Mm01336189\_m1
- CD36, NM\_001159555.1 • Mm01135198\_m1
- SRA, NM\_001168318.1 • Mm00512269\_m1
- ABCG1, NM\_009593.2 • Mm00437390\_m1
- ABCA1, NM\_013454.3 • Mm00442646\_m1
- ApoE, NM\_009696.3 • Mm00437573\_m1
- GAPDH, NM\_008084.2 • Mm99999915\_g1
- $\beta$ -actin, NM\_031491.1 • Mm00607939\_s1

## 第 9 節：肺粗抽出液の抽出と ELISA 法

実験動物から摘出した肺 50 mg に対してプロテアーゼインヒビターを含む CellLytic MT (Sigma-Aldrich 社) を 2 mL 注入し、氷上でホモジェナイザーにて破砕した。これを 4℃、12000 回転で 10 分間遠心分離し、上清を -80℃ で保存した。肺粗抽出液中の IL-1 $\beta$ 、MCP-1/CCL2、IL-6 濃度は ELISA 測定キット (R&D Systems 社) を用いてプロトコールに従って測定した。それぞれの ELISA 測定キットには、monoclonal anti IL-1 $\beta$  mouse antibody、monoclonal anti MCP-1 mouse antibody、monoclonal anti IL-6 mouse antibody が固相化されている。肺粗抽出液およびスタンダード溶液をプロトコールに応じて希釈後に添加し、2 時間室温で静置した。5 回洗浄を行った後にそれぞれのタンパクに応じた conjugate を添加し、2 時間室温で静置した。5 回洗浄を行った後に substrate solution を添加し、30 分間室温で静置した。Stop solution を添加後、吸光度を測定した。肺粗抽出液中

のそれぞれのタンパク濃度はスタンダード曲線を用いて算出後に総タンパク濃度で補正し、pg/mg protein で表示した。

## 第 10 節：肺胞マクロファージの分離

無治療の実験動物（ICR マウス、8–12 週齢）に第 2 章・第 4 節（気管支肺胞洗浄）と同様の方法を用いて気管支肺胞洗浄液を採取した。ただし、洗浄液には、Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM、Life Technologies 社）を使用した。気管支肺胞洗浄液を遠心塗沫器でスライドガラス上に展開し、Diff-Quick 染色後に検鏡し、マクロファージの割合が 95%以上であることを確認した。また、trypan blue 染色により細胞の生存率が 98%以上であることを確認した。洗浄液を 15℃・2500 回転で遠心分離し、得られた気管支肺胞洗浄細胞に 10%ウシ胎児血清（FBS）およびペニシリン（100 U/mL）・ストレプトマイシン（100 µg/mL）含有 DMEM を混和し懸濁させた。懸濁液を 48 ウェルプレートもしくは 4 ウェルカルチャースライド（BD 社）にそれぞれ  $2 \times 10^5$  cells/well、 $4 \times 10^5$  cells/well となるように滴下し、37℃、5% CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーター内で 2 時間培養し、肺胞マクロファージを接着させた。PBS で 2 回洗浄し、浮遊細胞を除去した。その後同じ培養液で一晩培養した。

## 第 11 節：培養細胞実験

### <第 1 項：培養細胞>

培養細胞実験では、①第 2 章・第 10 節で分離した肺胞マクロファージ、②RAW264.7 細胞、③ヒト肺胞上皮細胞、④A549 細胞を使用した。RAW264.7 細胞、ヒト肺胞上皮細胞、A549 細胞は、それぞれ American Type Culture Collection、ScienCell 社、Japanese Cancer Research Resources より購入した。肺胞マクロファージとヒト肺胞上皮細胞は細胞死の検討または TUNEL アッセイに用い、RAW264.7 細胞と A549 細胞は細胞増殖アッセイに用いた。各種培養細胞はすべて、37℃、5% CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーター内で培養した。

### <第 2 項：テムシロリムスへの曝露>

前述（第2章・第10節）のとおり 48 ウェルプレートで培養された肺胞マクロファージを、各種濃度のテムシロリムスもしくは vehicle を含有した培地で 24 時間培養した後に細胞死の検討を行った。また、ヒト肺胞上皮細胞を、poly-L-lysine coated 48 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で撒き、2% FBS ・ epithelial cell growth supplement ・ ペニシリン ・ ストレプトマイシン含有の alveolar epithelial cell medium（ScienCell 社）で 3 日間培養し、70%コンフルエントとなるのを確認した。肺胞マクロファージと同様、各種濃度のテムシロリムスもしくは vehicle を含有した培地で 24 時間培養した後に細胞死の検討を行った。また、4 ウェルカルチャースライドで培養された肺胞マクロファージは、各種濃度のテムシロリムスもしくは vehicle を含有した培地で 24 時間培養した後に TUNEL アッセイを施行した。細胞死の検討および TUNEL アッセイの陽性対照薬として、ブレオマイシンを用いた。

RAW264.7 細胞および A549 細胞を、96 ウェルプレートに  $3 \times 10^3$  cells/well で撒き、肺胞マクロファージの培養液と同じ培養液で一晩培養した。各種濃度のテムシロリムスもしくは vehicle を含有した培地（100  $\mu$ L/ well）で 24 時間培養した後に細胞増殖アッセイを施行した。

#### <第3項：細胞増殖アッセイ>

前述（第2章・第11節・第2項）のとおり薬物を曝露された RAW264.7 細胞および A549 細胞に WST-1 reagent（Roche 社）を 10  $\mu$ L/well で混和し、1 時間培養した。ホルマザン産物の吸光度波長 450 nm を測定し、対照波長は 650 nm とした。算出した[450 nm の吸光度 - 650nm の吸光度]を細胞数の指標とした。

#### <第4項：細胞死の検討>

第2章・第11節・第2項のとおり薬物を曝露された肺胞マクロファージとヒト肺胞上皮細胞に、propidium iodide（PI、BD社）およびHoechst 33342（Dojindo社）をそれぞれ8.6  $\mu$ Mおよび10  $\mu$ g/mLとなるように添加し、細胞核をIX71倒立型リサーチ顕微鏡（Olympus 社）で観察した。Hoechst 33342はWU励起フィルターを用いて観察し、PIはWIG励起フィルターを用いて観察した。死細胞の核はPI（赤色）により観察され、すべての細胞の核はHoechst 33342（青色もしくはピンク色）により観察された。それぞれのウェルで最低200個の細胞を評価し、死細胞の割合（%）を、[PI陽性細胞数/Hoechst 33342陽性細胞数  $\times$  100]の計算式で算出した。

#### <第5項：TUNEL アッセイ>

第2章・第11節・第2項の通りに培養された肺胞マクロファージを、DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega 社) を用いて TUNEL アッセイした。培養細胞を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、PBS でリンスした後に 0.2% Triton X-100 含有 PBS で 5 分間浸透化した。rTdT バッファーでプレインキュベーションし、rTdT / FITC-labeled dUT 含有の rTdT バッファーを添加し、37℃で 60 分間静置した。10mM EDTA 添加後 15 分間静置し、反応を終了させた。PBS で洗浄した後に、1 µg/mL の PI で対比染色し、細胞核を IX71 倒立型リサーチ顕微鏡で観察した。FITC は GFP 励起フィルターで観察し、PI は WIG 励起フィルターを用いて観察した。それぞれのウェルで最低 200 個の細胞を評価し、アポトーシス細胞の割合 (%) は、 $[\text{FITC 陽性細胞数} / \text{PI 陽性細胞数} \times 100]$  の計算式で算出した。

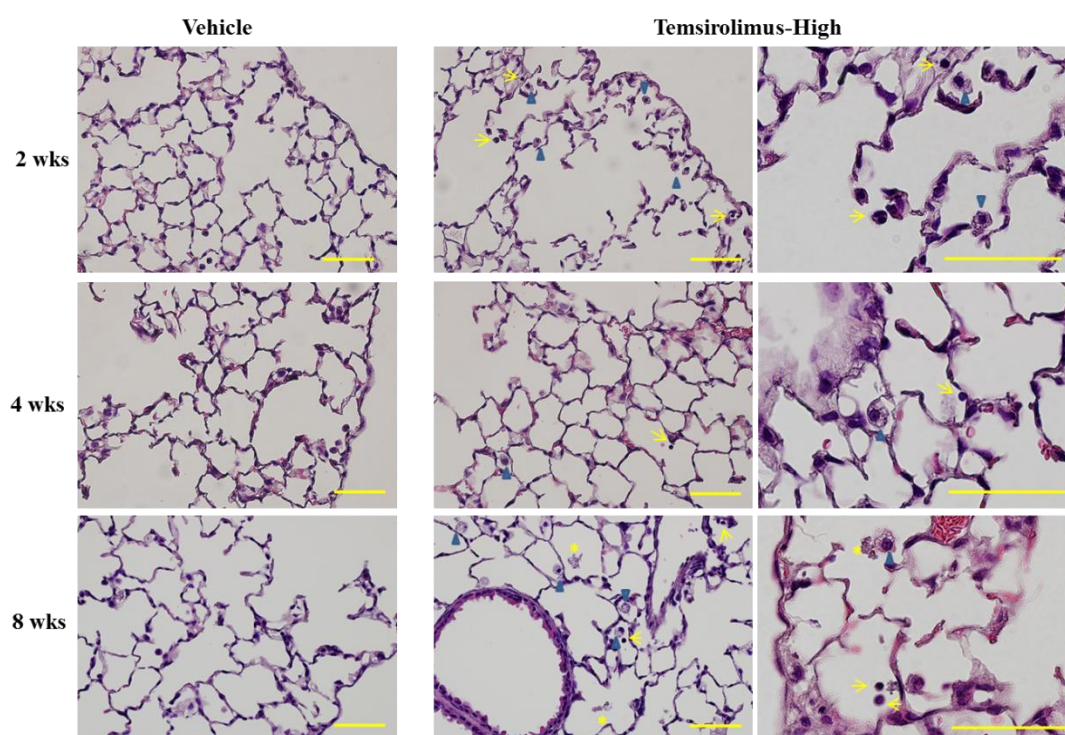
## 第 12 節：統計解析

すべての数値は平均値±標準誤差で表記している。統計解析には GraphPad Prism (version 5.0d) ソフトウェアを使用した。記載がない限りは、多群間の比較には Kruskal-Wallis test / Dunn's post hoc comparison test もしくは two-way ANOVA / Bonferroni multiple post hoc comparison test を用いた。

### 第3章 実験結果

#### 第1節：肺の組織学的変化の検討

コントロールマウスと比較して、テムシロリムスを投与したマウスでは肺胞腔内や肺胞隔壁への炎症細胞の浸潤や肺胞腔内での泡沫状マクロファージの部分的集簇が認められた (Fig. 1)。テムシロリムスを2週間もしくは4週間投与したマウスの肺の組織学的所見は同様であったが、テムシロリムスを8週間投与したマウスでは、上記所見がより顕著となり、肺胞腔内に *fibrinous exudate* の出現も認められた。しかし、肺の構造が破壊された像は認められなかった。

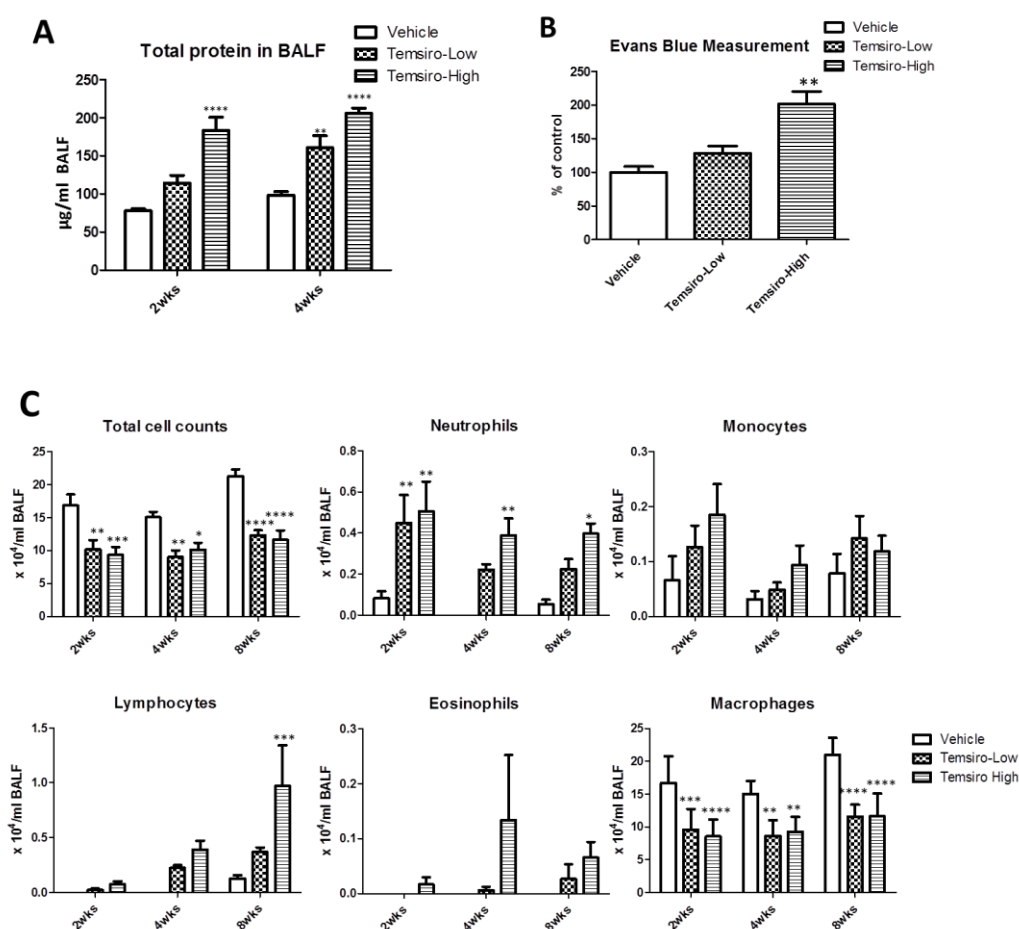


**Fig. 1** 肺の組織学的変化

テムシロリムス高用量群および vehicle 群の肺組織学的所見を示す (scale bar: 50  $\mu$ m)。テムシロリムス高用量投与群では、*fibrinous exudate* (\*)や泡沫状マクロファージ (矢頭)、炎症細胞浸潤 (矢印) が認められる。

## 第2節：肺血管透過性の変化と炎症細胞浸潤の検討

肺血管透過性を評価するために、気管支肺胞洗浄液上清中のタンパク濃度と肺の EBD 量を検討した。Fig. 2A・B に示すように、気管支肺胞洗浄液上清中のタンパク濃度および肺の EBD 量はテムシロリムスを投与した群で、用量依存的に増加した。次に、肺胞腔内への炎症細胞浸潤を評価するために、気管支肺胞洗浄細胞の分画を検討した。Fig. 2C に示すように、テムシロリムスを投与した群で、用量依存的に好中球・リンパ球・単球・好酸球が増加した。好中球と単球の増加は2週間投与時に顕著であったが、リンパ球は投与期間に依存して増加した。



**Fig. 2 肺血管透過性と炎症細胞浸潤**

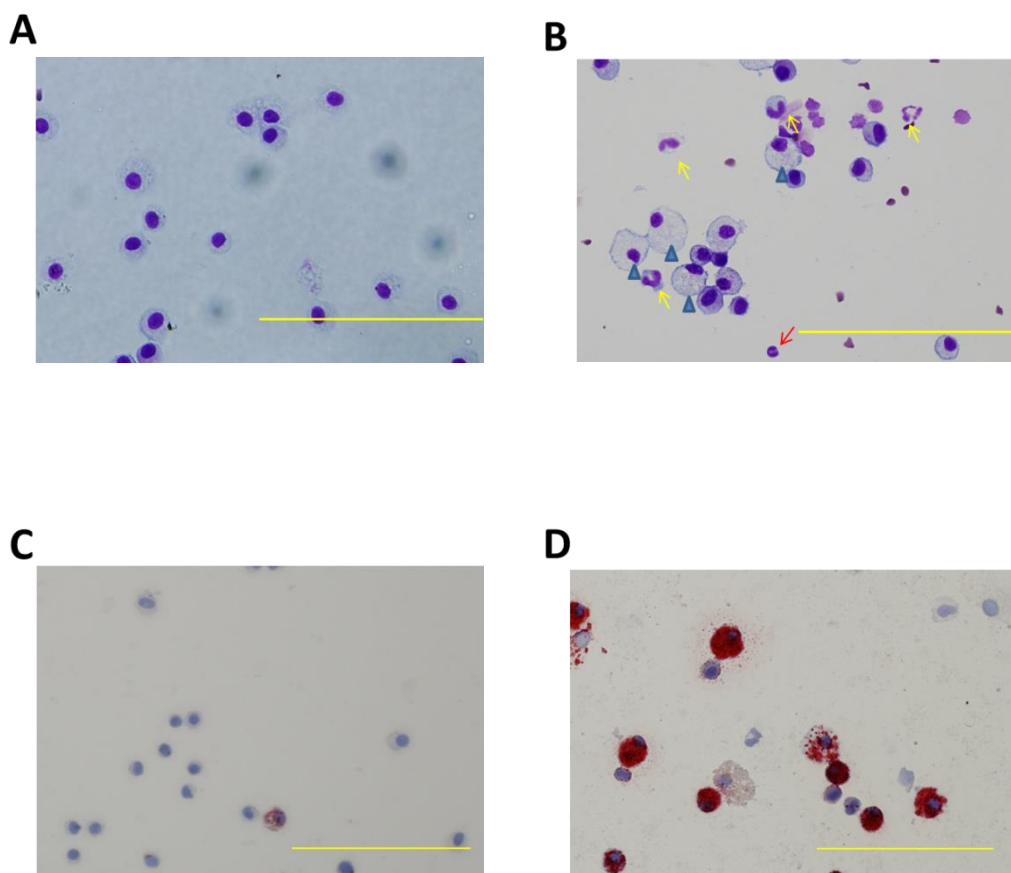
気管支肺胞洗浄液上清中のタンパク濃度 (A : 2/4 週投与群、n=4) および肺の EBD 量 (B : 2 週投与群、n=6—7)、気管支肺胞洗浄液における総細胞数および各種細胞数 (C : 2/4/8 週投与群、n=6)。Mean ± SEM、\* p<0.05、\*\* p<0.01、\*\*\* p<0.01、\*\*\*\* p<0.0001 versus vehicle。

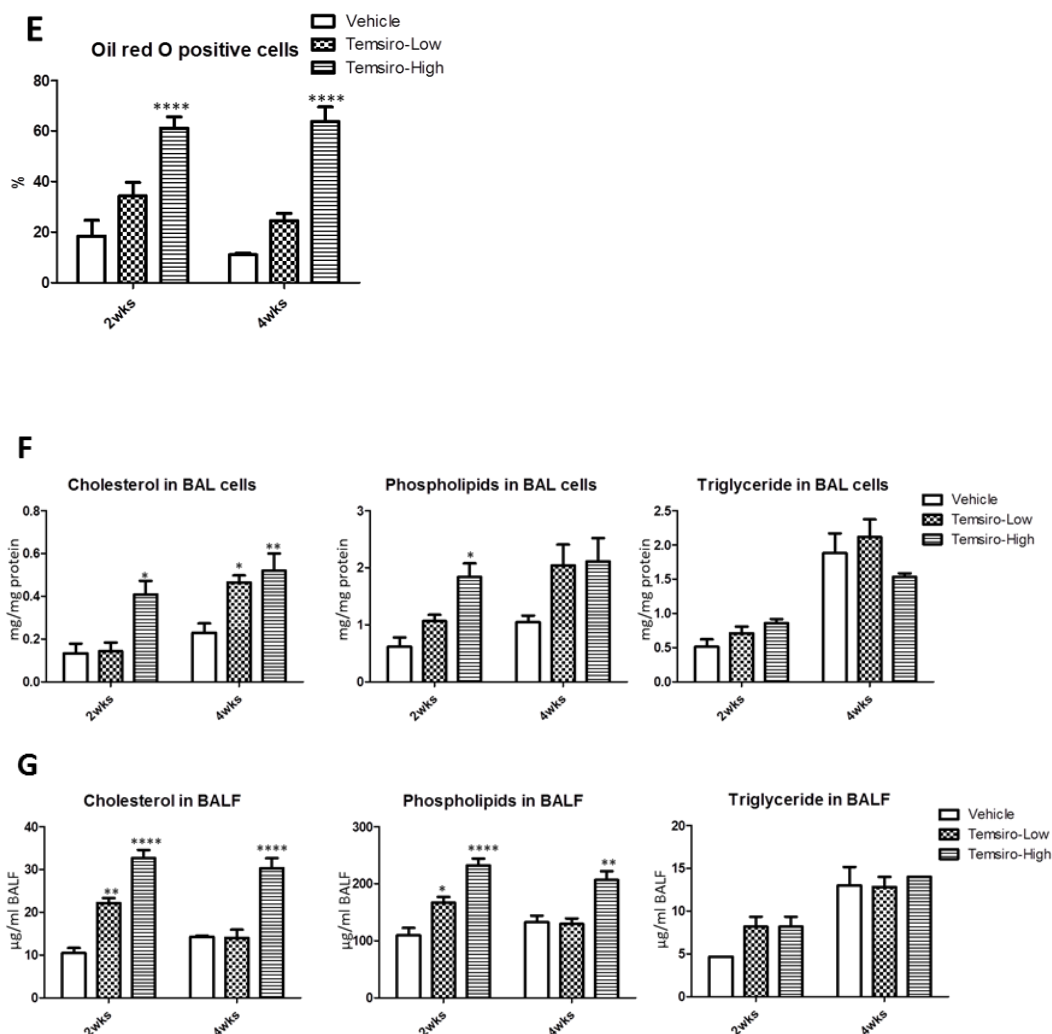
BALF : 気管支肺胞洗浄液

### 第3節：肺胞腔内および肺泡マクロファージ内への脂質蓄積の検討

Diff-Quick で染色された気管支肺泡洗浄細胞を検鏡すると、テムシロリムスを投与した群では肺泡マクロファージが泡沫化していた (Fig. 3A・B)。肺泡マクロファージの泡沫化は、細胞内への脂質蓄積を示唆する。そこで neutral lipids 蓄積の有無を評価するべく気管支肺泡洗浄細胞の Oil-red O 染色を行った。Oil-red O で染色される肺泡マクロファージは、テムシロリムス投与群で用量依存的に増加した (Fig. 3C-E)。

次に、肺胞腔の細胞内および細胞外に蓄積している脂質の成分を評価するために、気管支肺泡洗浄細胞・気管支肺泡洗浄液上清それぞれの脂質量を測定した。Fig. 3F・G に示すように、気管支肺泡洗浄細胞・気管支肺泡洗浄液上清それぞれの総コレステロール量およびリン脂質量が、テムシロリムス投与群で用量依存的に増加した。一方で、中性脂肪量は群間で有意差を認めなかった。





**Fig. 3 肺における脂質蓄積の検討**

気管支肺胞洗浄細胞の Diff-Quick 染色像を示す (A : vehicle 4 週投与群、B : 高用量テムシロリムス 4 週投与群)。高用量テムシロリムス投与群では、泡沫状マクロファージ(矢頭)、好中球 (黄色矢印)、リンパ球 (赤色矢印) が認められる (scale bar: 100  $\mu$ m)。気管支肺胞洗浄細胞の Oil-red O 染色像 (C : vehicle 4 週投与群、D : 高用量テムシロリムス 4 週投与群、scale bar: 100  $\mu$ m) および Oil-red O 陽性細胞の割合 (E : 2/4 週投与群、n=3—4) を示す。高用量テムシロリムス投与群では、Oil-red O 陽性細胞が多く認められる。気管支肺胞洗浄細胞 (F : 2/4 週投与群、n=3—4) ・気管支肺胞洗浄液上清 (G : 2/4 週投与群、n=3—4) 中の総コレステロール量、リン脂質量、中性脂肪量を示す。Mean  $\pm$  SEM、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*\*  $p < 0.0001$  versus vehicle。

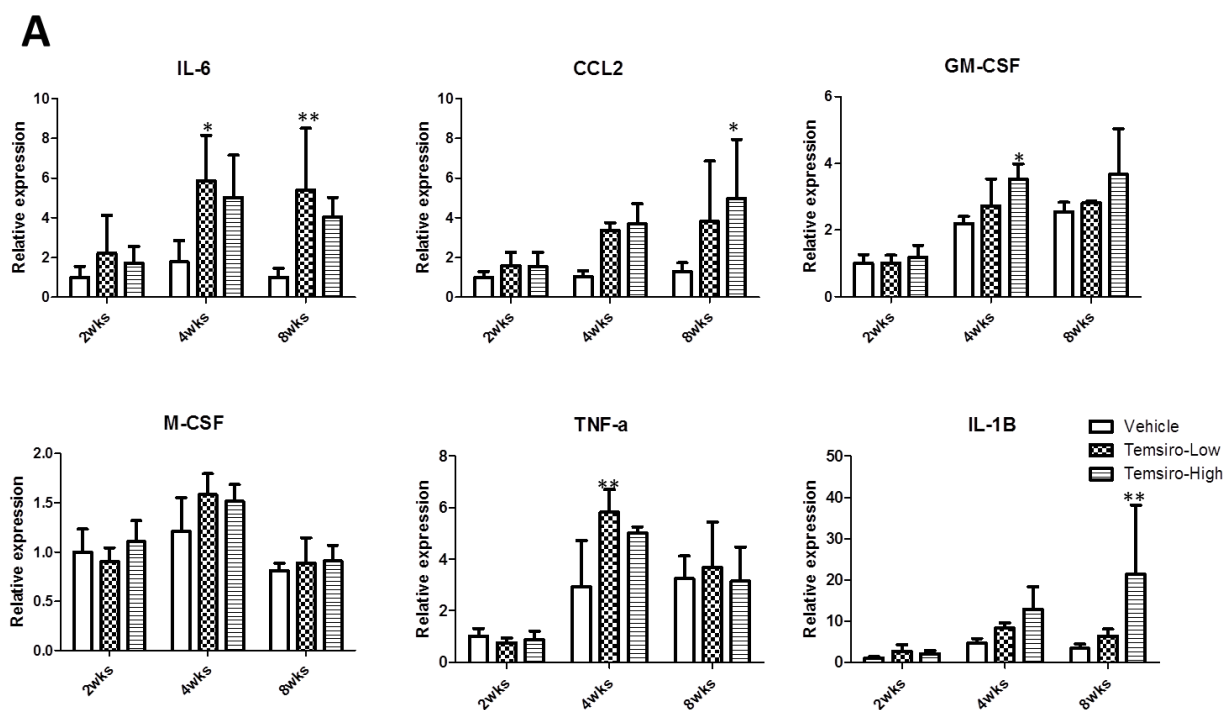
BALF : 気管支肺胞洗浄液 BAL cells : 気管支肺胞洗浄細胞

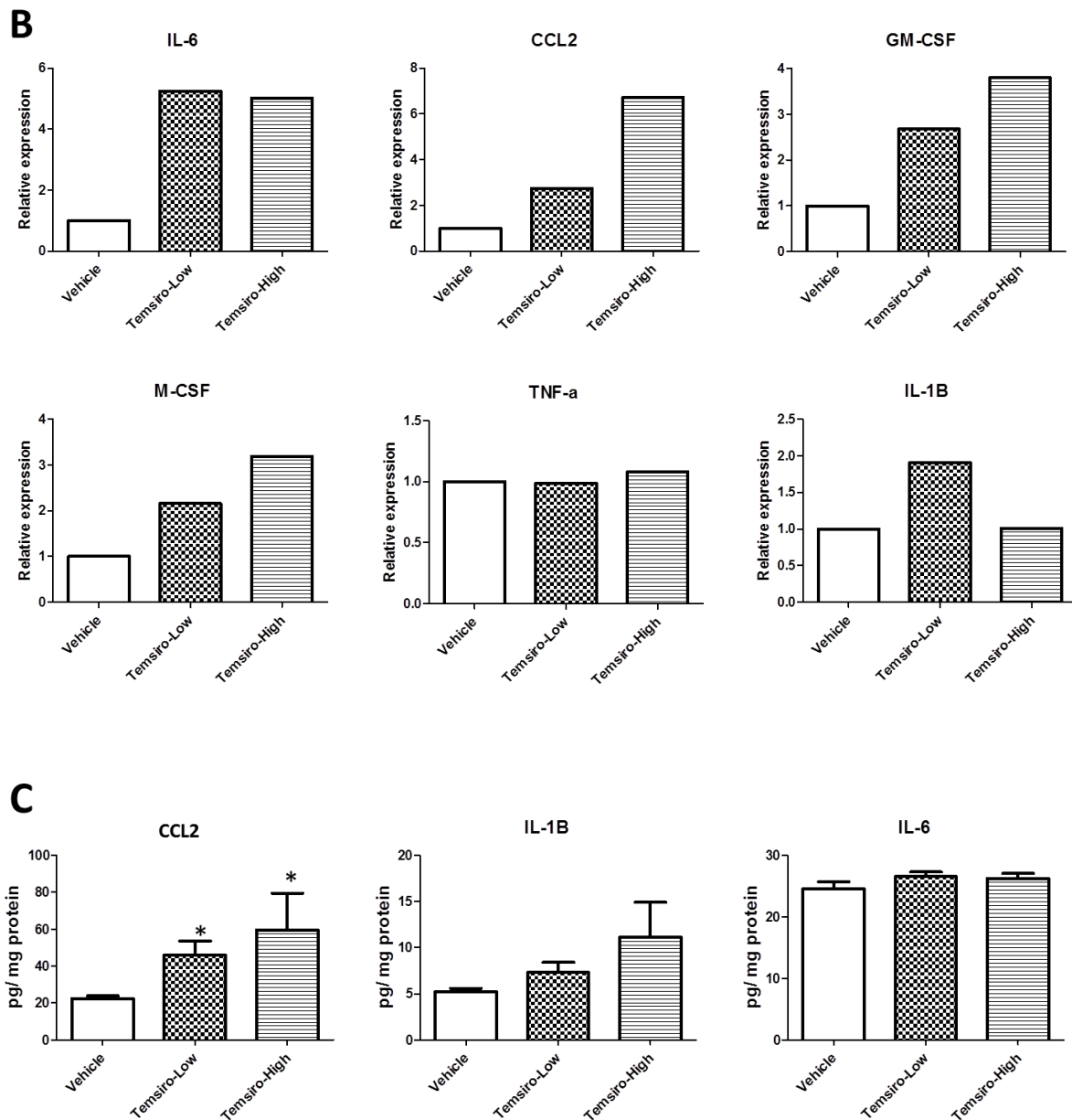


#### 第4節：肺組織および気管支肺胞洗浄細胞における炎症性サイトカイン発現の検討

肺組織および気管支肺胞洗浄細胞における炎症性サイトカインの mRNA 発現を検討した。肺組織においては、vehicle 投与群で GM-CSF、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現が投与期間に依存して増加した (Fig. 4A)。テムシロリムス投与群では、vehicle 投与群と比較して、IL-6、CCL2/MCP-1、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現が増加した (Fig. 4A)。気管支肺胞洗浄細胞においては、テムシロリムス投与群で、IL-6、CCL2/MCP-1、GM-CSF、M-CSF の mRNA 発現が増加した (Fig. 4B)。

次に、8 週投与群において、肺粗抽出液中の CCL2/MCP-1、IL-1 $\beta$  および IL-6 のタンパク濃度を測定した。IL-6 の濃度は群間で同等であったが、CCL2/MCP-1 と IL-1 $\beta$  の濃度はテムシロリムス投与群で増加した (Fig. 4C)。





**Fig.4 肺組織および気管支肺胞洗浄細胞における炎症性サイトカイン発現**

肺組織（A：2／4／8週投与群、n=4）および気管支肺胞洗浄細胞（B：8週投与群、n=2 sets from three mice）における炎症性サイトカインの mRNA 発現を示す。肺粗抽出液中の CCL2/MCP-1、IL-1β、IL-6 のタンパク量（C：8週投与群、n=7）を示す。Mean ± SEM、\* p<0.05、\*\* p<0.01 versus vehicle。

## 第5節：血清中の脂質成分の検討

肺への脂質蓄積の機序を検討した。mTOR 阻害薬の有害反応としては、脂質異常症が知られている<sup>(3)</sup>。このモデルマウスにおいても、脂質異常症が肺における脂質蓄積に寄与している可能性があるため、血清中の脂質成分を測定した。しかし、Table 1 に示すように、血清中のコレステロールおよび中性脂肪に有意な群間差は認められなかった。これらの結果より、少なくともこのモデルマウスにおいては、肺への脂質蓄積に脂質異常症は寄与していないことが示された。

	Cholesterol (mg/dl)			Triglyceride (mg/dl)		
	Total	HDL	Non-HDL	Total	HDL	Non-HDL
Vehicle	89.4 ± 11.6	68.2 ± 8.1	21.2 ± 3.6	118.0 ± 20.2	2.5 ± 0.4	115.5 ± 20.0
Temsiro-Low	126.0 ± 15.4	96.7 ± 12.4	29.2 ± 3.3	116.2 ± 11.5	2.3 ± 0.2	114.0 ± 11.4
Temsiro-High	115.2 ± 7.0	90.6 ± 9.3	24.6 ± 5.7	60.7 ± 17.1	2.7 ± 0.8	57.9 ± 16.3

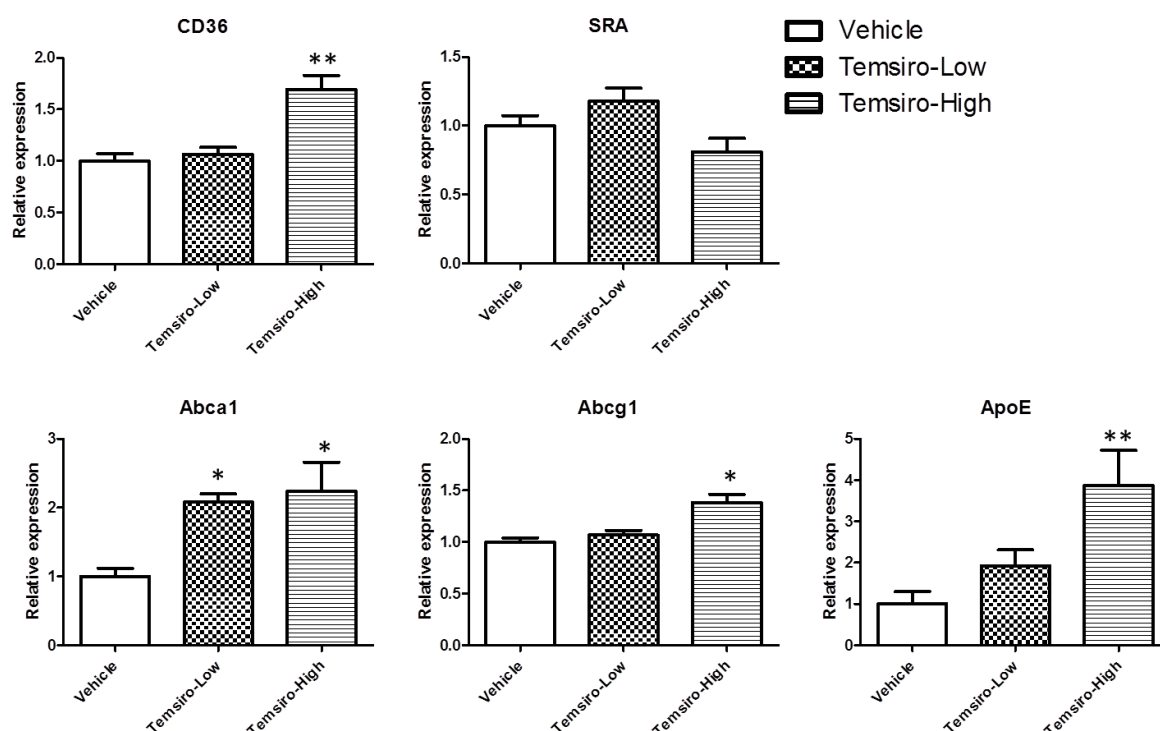
**Table 1** 血清中の脂質成分

血清中の脂質成分を示す（2週投与群、n=4）。血清中のコレステロールおよび中性脂肪に有意な群間差は認められなかった。Mean ± SEM。

Temsiro：テムシロリムス、HDL：high density lipoprotein

## 第 6 節：マクロファージの脂質代謝機能に及ぼす影響の検討

肺泡マクロファージの機能障害によって、肺サーファクタントが蓄積することが報告されている<sup>(18)</sup>。そこで、気管支肺泡洗浄細胞より RNA を抽出し、脂質の取り込みに寄与する cluster of differentiation 36 (CD36) と scavenger receptor class A (SRA)、脂質の逆輸送に寄与する ATP-binding cassette sub-family A member 1 (ABCA1)、ATP-binding cassette sub-family G member 1 (ABCG1)、apolipoprotein E (ApoE) の mRNA 発現を検討した。これらの mRNA 発現はテムシロリムス投与群で増加もしくは著変なしであった (Fig. 5)。

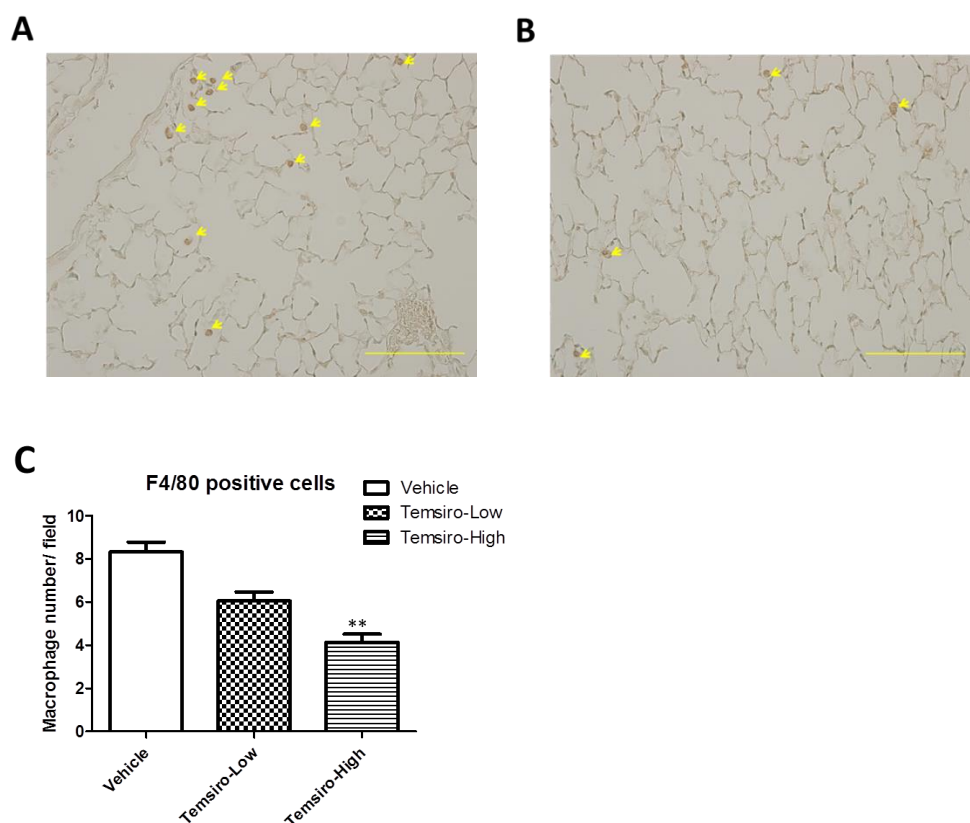


**Fig. 5** 気管支肺泡洗浄細胞における脂質代謝に関与する遺伝子のmRNA発現

気管支肺泡洗浄細胞 (2 週投与群、n=6) における脂質代謝に関与する遺伝子の mRNA 発現を示す。Mean  $\pm$  SEM、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  versus vehicle。

## 第7節：テムシロリムスの肺胞マクロファージ数に及ぼす影響の検討

肺胞マクロファージの減少によって、肺サーファクタントが増加することがラットを用いた検討により示されている<sup>(19)</sup>。また、**mTOR** 阻害薬が血中のマクロファージや単球を減少させることも示されている<sup>(20-22)</sup>。そこで、テムシロリムスが肺胞マクロファージを減少させるか否かを検討した。**Fig. 2C** に示すように、気管支肺胞洗浄液中の肺胞マクロファージはテムシロリムス投与群で減少した。次に、マクロファージの表面抗原である **F4/80** の免疫染色を行い、組織学的に肺胞マクロファージの数を検討した。**Fig. 6 A-C** に示すように、テムシロリムス投与群で肺胞マクロファージが減少した。



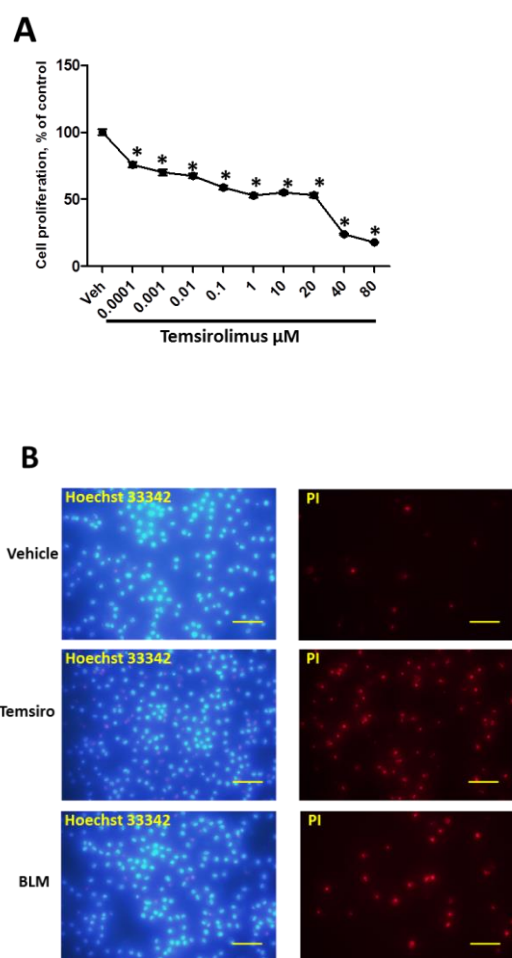
**Fig. 6** 肺組織中の F4/80 陽性細胞

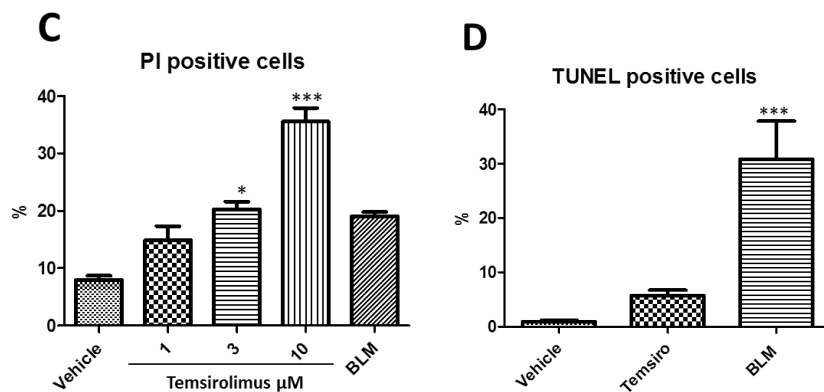
肺組織中の F4/80 免疫染色像 (A : vehicle 2 週投与群、B : 高用量テムシロリムス 2 週投与群) を示す (scale bar: 100  $\mu$ m)。1 視野あたりの F4/80 陽性細胞数 (C : 2 週投与群、n=3-4) を示す。Mean  $\pm$  SEM、\*\* p<0.01 versus vehicle。

## 第 8 節: 肺胞マクロファージと肺胞上皮細胞に対するテムシロリムスの細胞傷害性の検討

培養細胞実験において、テムシロリムスが肺胞マクロファージに対する細胞傷害性を有する否かを検討した。Fig. 7A に示すように、テムシロリムスはマクロファージの細胞株である RAW264.7 の細胞増殖を濃度依存的に抑制した。初代培養した肺胞マクロファージにおいて、テムシロリムスは濃度依存的に細胞死を増加させた (Fig. 7B・C)。次に、テムシロリムスがアポトーシスを誘導するか否かについても検討した。陽性対照薬であるブレオマイシンではアポトーシスを示す TUNEL 陽性細胞が増加したが、テムシロリムスではほとんど TUNEL 陽性細胞は増加しなかった (Fig. 7D)。

次に、テムシロリムスが肺胞上皮細胞に対する細胞傷害性を有するか否かを検討した。Fig. 8A–C に示すように、テムシロリムスは、肺胞上皮細胞の細胞死を増加させ、細胞増殖を抑制した。

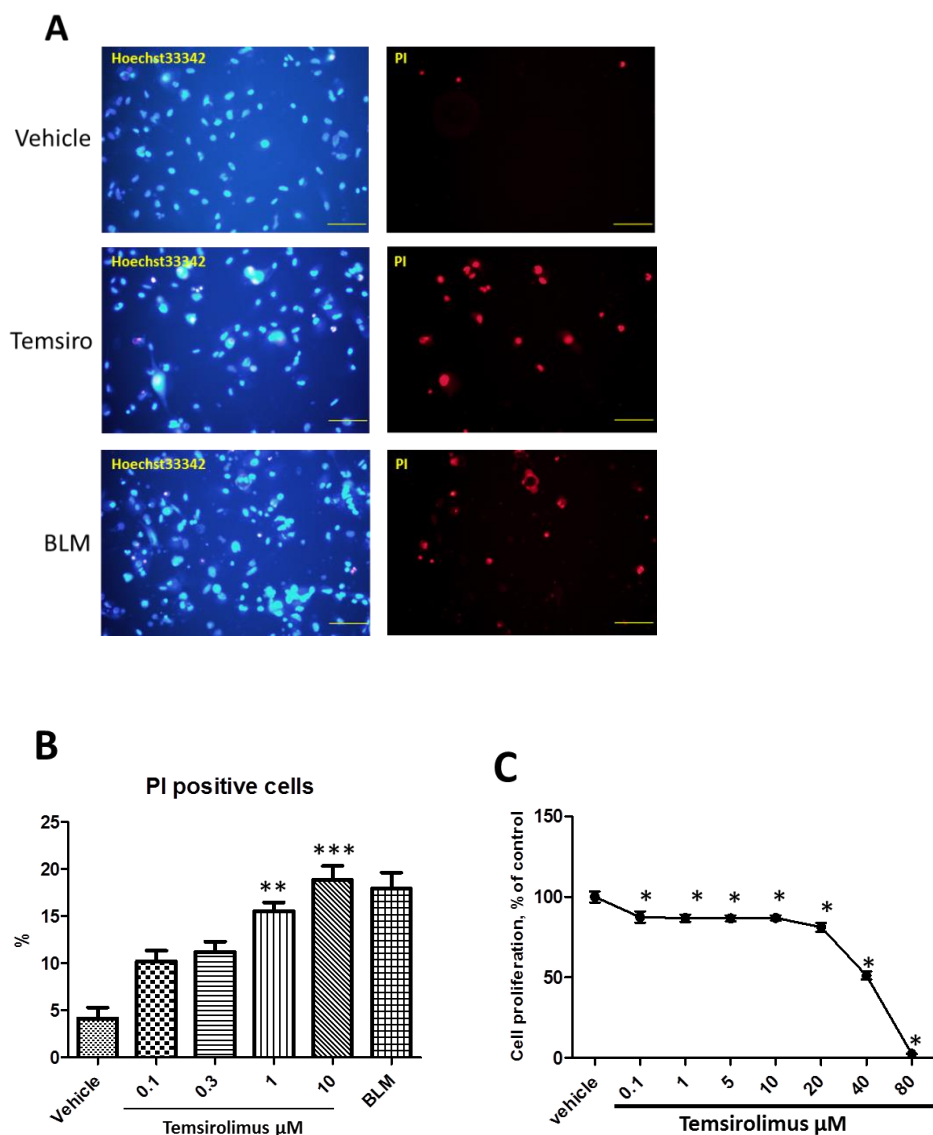




**Fig. 7 テムシロリムスの肺胞マクロファージに対する細胞傷害性の検討**

RAW264.7 を用いた細胞増殖アッセイの結果 (A : n=12) を示す。テムシロリムスは濃度依存的に RAW264.7 の細胞増殖を抑制した (Mean、\*  $p < 0.05$  versus vehicle、one-way ANOVA with a Dunnett's post-hoc comparison test)。各種薬物を投与された肺胞マクロファージの Hoechst33342 染色および PI 染色像 (B : vehicle/テムシロリムス 10  $\mu$ M/ブレオマイシン 500  $\mu$ g/mL、scale bar: 50  $\mu$ m) を示す。各種薬物を投与された肺胞マクロファージにおける死細胞の割合 (C : n=6) を示す。各種薬物を投与された肺胞マクロファージにおける TUNEL 陽性細胞の割合 (D : n=6) を示す。Mean  $\pm$  SEM、\*  $p < 0.05$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  versus vehicle。

Temsiro : テムシロリムス、BLM : ブレオマイシン、PI : Propidium iodide



**Fig. 8** テムシロリムスの肺胞上皮細胞に対する細胞傷害性の検討

各種薬物を投与されたヒト肺胞上皮細胞の Hoechst33342 染色および PI 染色像 (A : vehicle/テムシロリムス 10  $\mu$ M/ブレオマイシン 100  $\mu$ g/mL, scale bar: 100  $\mu$ m) を示す。各種薬物を投与された肺胞マクロファージにおける死細胞の割合 (B : n=6) を示す。Mean  $\pm$  SEM、\*\* p<0.01、\*\*\* p<0.001 versus vehicle。A549 を用いた細胞増殖アッセイの結果 (C : n=12) を示す。テムシロリムスの濃度依存的に A549 の細胞増殖を抑制した (Mean、\* p<0.01 versus vehicle、one-way ANOVA with a Dunnett's post-hoc comparison test)。

Temsiro : テムシロリムス、BLM : ブレオマイシン、PI : Propidium iodide



## 第4章 考察

肺胞上皮や肺血管内皮の傷害は肺の間質や肺胞腔内への炎症細胞の浸潤を引き起こし、これらが間質性肺炎やBOOPを含む間質性肺疾患発症の最初の機序とされる<sup>(23-26)</sup>。肺胞上皮や血管内皮の傷害は、肺血管透過性の亢進を引き起こし、血漿中タンパクの肺胞腔内漏出や肺胞腔内へのフィブリン形成を促進させる。申請者らは、本研究において、テムシロリムスを投与したマウスでは、気管支肺胞洗浄液のタンパク濃度と肺内EBD量が増加することを見出し、肺血管透過性が亢進することが示唆された (Fig. 2A・B)。さらに、気管支肺胞洗浄液の細胞分画や肺の組織学的変化の検討により、テムシロリムスが肺胞腔内への炎症細胞浸潤やfibrinous exudateの形成を引き起こすことを見出した (Fig. 1、2C)。これらの結果より、テムシロリムスが肺胞上皮や血管内皮の傷害を引き起こしているものと考えられる。

次に、テムシロリムスが肺胞上皮細胞に対して細胞傷害性や細胞増殖抑制効果を有するかどうかを検討するために、ヒト肺胞上皮細胞（プライマリーカルチャー）とヒト肺胞上皮細胞の細胞株である A549 を用いて培養細胞実験を行った。テムシロリムスは、1  $\mu\text{M}$  以上の濃度で細胞傷害性を発揮し、0.1  $\mu\text{M}$  以上の濃度で細胞増殖抑制効果を発揮した (Fig. 8A-C)。既報では、mTOR 阻害薬（テムシロリムスやラパマイシン）は、ヒト臍帯静脈内皮細胞やヒト肺微小血管内皮細胞に対して、比較的低濃度（0.1–100 nM）で細胞傷害性や細胞増殖抑制効果を発揮することが示されている<sup>(27-30)</sup>。動物実験においても、ラパマイシンが急性肺障害モデルマウス（ブレオマイシン誘発性やリポポリサッカライド誘発性）における肺障害を増悪させることが示されている<sup>(31, 32)</sup>。臨床症例においては、肺胞上皮傷害や肺血管透過性亢進で高値を示すとされる間質性肺疾患のバイオマーカーである血清 Krebs von den Lungen 6 (KL-6) が、エベロリムスによる間質性肺疾患でも高値となることが示されている<sup>(33, 34)</sup>。これらの結果から、mTOR 阻害薬は肺胞上皮や肺血管内皮の傷害を引き起こすことにより肺障害を発症または増悪させていることが示唆される (Fig.9：左側の経路)。

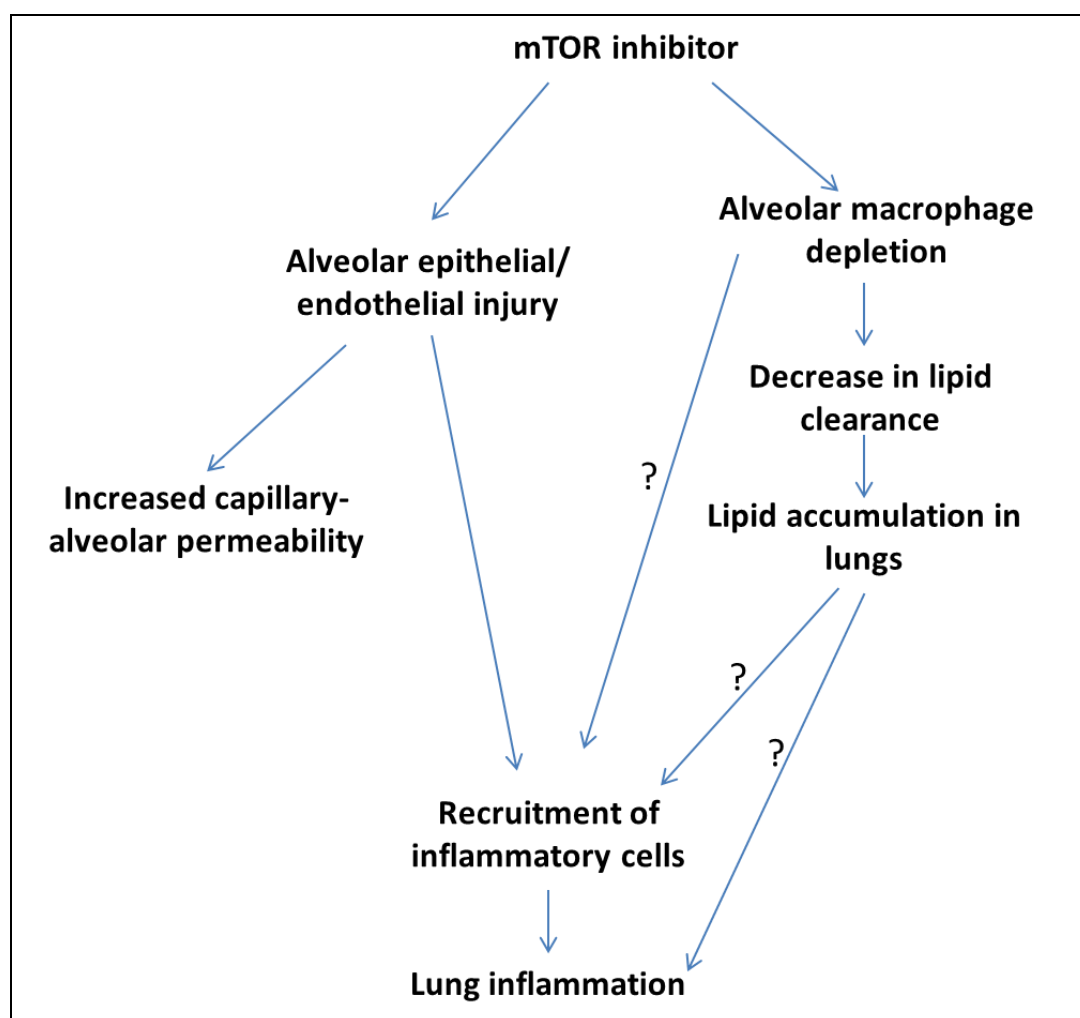
肺サーファクタントの異常は、急性呼吸促迫症候群や肺サルコイドーシス、気管支喘息、肺胞蛋白症を含む多くの肺疾患を引き起こす<sup>(35-37)</sup>。肺サーファクタントは、II型肺胞上皮細胞によって産生され、二つの経路により分解・除去される。ひとつは、II型肺胞上皮細胞が肺サーファクタントをendocytosisし、recycleを行い、新たな肺サーファクタントとする経路である。もうひとつは、肺胞マクロファージによる貪食・分解の経路であり、この経路が肺サーファクタントの除去・異化の中心的な役割を果たすとされる<sup>(38)</sup>。肺胞マクロファージは肺サーファクタントのクリアランスに中心的な役割を果たすため、肺胞マクロファージ

ジの減少は肺サーファクタントの蓄積につながる可能性がある。実際、ラットを用いた研究では、dichloromethylene diphosphonic acidが肺泡マクロファージの減少および肺サーファクタントの蓄積を引き起こすことが示されている<sup>(19)</sup>。本研究においても、テムシロリムスが肺泡マクロファージの減少と肺サーファクタント脂質蓄積を引き起こすことを見出した (Fig. 2C、3A–G、6C)。肺サーファクタント脂質の増加は、肺泡マクロファージの減少が原因と考えられる。肺サーファクタント脂質の蓄積を引き起こすその他の機序として、次なようなことが考えられる。ひとつの可能性として、肺泡マクロファージの機能障害、つまり、細胞内への取り込みや血管への逆輸送の障害が考えられる。しかし、本研究では、気管支肺泡洗浄細胞において、脂質の取り込みに寄与するCD36、SRAのmRNA発現、および、脂質の逆輸送に寄与するABCA1、ABCG1、ApoEのmRNA発現は増加もしくは著変なしであり、肺泡マクロファージの機能障害による肺サーファクタント脂質蓄積の可能性は低いことが示唆された (Fig. 5)。もう一つの可能性として、II型肺泡上皮細胞による脂質の取り込みや分解機能の障害も考えられる。

mTOR 阻害薬の単球やマクロファージに対する細胞傷害性もしくは増殖抑制効果を示す研究結果がいくつか報告されている。テムシロリムスは K-ras<sup>LA1</sup> マウスにおいて、alveolar epithelial neoplasia 内のマクロファージを減少させる<sup>(39)</sup>。また、臨床症例においては、エベロリムスの投与は気管支肺泡洗浄液中の肺泡マクロファージが減少させる<sup>(40, 41)</sup>。さらに、臨床研究や動物実験において、mTOR 阻害薬が白血球減少症を引き起こすことも示されている<sup>(2, 3, 16)</sup>。既報の培養細胞実験においては、ラパマイシンが単球やマクロファージの細胞増殖を抑制し、オートファジーやアポトーシスを介して細胞死を誘導することが示されている<sup>(20–22, 42)</sup>。申請者らは、本研究においても、動物実験においてテムシロリムスが肺泡マクロファージ数を減少させることを見出し、また、培養細胞実験においては、低濃度のテムシロリムス ( $\geq 0.1$  nM) でマクロファージの細胞増殖を抑制し、高濃度のテムシロリムス ( $\geq 3$   $\mu$ M) では肺泡マクロファージの細胞死を誘導することを見出した (Fig. 7A–C)。また、ブレオマイシンでは TUNEL 陽性細胞が増加したのに対して、テムシロリムスでは TUNEL 陽性細胞がほとんど認められなかったこと (Fig. 7D) より、テムシロリムスによる細胞死はアポトーシスよりもネクローシスを介して引き起こされていることが示唆される。本研究の動物モデルにおいて、テムシロリムスが肺泡マクロファージを減少させることを見出したが、他臓器のマクロファージや単球に対する影響は検討しておらず、今後の課題と考えられた。

泡沫状マクロファージは BOOP、肉芽腫性間質性肺炎、リポイド肺炎など様々な肺疾患で認められる<sup>(13–15)</sup>。泡沫状マクロファージは、mTOR 阻害薬による間質性肺疾患を含む薬

物誘発性間質性肺疾患においても認められる<sup>(43-45)</sup>。泡沫状マクロファージの形成がどのようにこれらの肺疾患の発症に関与しているのかは不明であるが、肺における脂質代謝障害が泡沫状マクロファージの形成と肺の炎症を引き起こすことが、いくつかの動物実験で示されている<sup>(18, 46, 47)</sup>。また、肺胞上皮の傷害も肺の炎症を引き起こすことも示されている<sup>(24)</sup>。申請者らは、本研究において、テムシロリムスが肺の泡沫状マクロファージ形成や肺サーファクタント脂質蓄積、肺胞上皮傷害を引き起こすことを示した。そこで、肺や気管支肺胞洗浄細胞における炎症性サイトカインの発現についても検討した。テムシロリムスは、肺および気管支肺胞洗浄細胞の両方で炎症性サイトカインの発現を亢進させ (Fig. 4A-C)、さらに、気管支肺胞洗浄液中のリンパ球も増加させた (Fig. 2C)。また、これらの肺の炎症所見は治療期間に依存して増悪した。これらの結果から、この動物モデルにおいて、テムシロリムスが肺の炎症を惹起することが明らかとなり、この肺の炎症は肺への脂質蓄積や肺胞上皮傷害と関連があると考えられた (Fig. 9)。



**Fig. 9** mTOR 阻害薬による肺の炎症惹起の推定機序

mTOR 阻害薬は炎症反応に対して多様な効果を発揮する<sup>(48)</sup>。mTOR は T 細胞の G1 期から S 期への移行を調節しており、mTOR 阻害薬は CD4 陽性 T 細胞の増殖を抑制する。また、mTOR 阻害薬は IL-6 を含むいくつかの炎症性サイトカインの発現を抑制し、MCP-1 により刺激された細胞の遊走能も抑制する<sup>(49, 50)</sup>。これらはいずれも mTOR 阻害薬の免疫抑制効果である。一方で、mTOR 阻害薬は炎症を促進させる特性も有する。mTOR の阻害は、ヒトやマウスのマクロファージにおいて、リポポリサッカライドや結核菌の刺激による IL-12 や IL-23 の発現を亢進させる<sup>(48)</sup>。また、mTOR 阻害薬は、血管内皮細胞における nuclear factor- $\kappa$ B の活性化を促進させることにより、トロンビンによる intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現を亢進させる。ICAM-1 の発現亢進により、白血球の血管内皮への接着が誘導され、血管内皮細胞間隙遊走が促進される。mTOR 阻害薬のこれらの多様な特性は、本研究における肺の炎症に対しても様々な影響を及ぼしている可能性がある。

肺胞マクロファージは、病原体の肺への侵入時に宿主が防御機構を開始・遂行する際に中心的な役割を果たす。しかし、肺胞マクロファージは、肺の炎症を修復させる際にも重要な役割を果たすことが示されてきている<sup>(51-53)</sup>。肺炎球菌による肺炎モデルにおいて、肺胞マクロファージを減少させた群では、コントロール群と比較して、肺の炎症性サイトカイン発現亢進と活性化した好中球の増加が認められたのみならず、アポトーシスや細胞死を来した好中球の増加も認められた<sup>(53)</sup>。さらに、肺胞マクロファージを減少させた群でのみ、肺組織の破壊像が認められた。肺胞マクロファージの減少は、肺サーファクタントの増加のみならず、炎症の修復障害にも寄与する可能性がある。

本研究にはいくつかのlimitationがある。ひとつは、mTOR阻害薬による間質性肺疾患症例で認められる器質化肺炎や肉芽腫などの組織像が、本研究におけるテムシロリムス投与マウスにおいて認められなかったことである。さらに、テムシロリムス投与マウスにおける肺への炎症細胞浸潤の程度も、mTOR阻害薬による間質性肺疾患症例の所見と比較して、軽度であった。この原因としては、種の違いや癌患者と正常マウス間の治療前の炎症状態の差などが考えられる。もうひとつのlimitationとして、1種類のマウスでしか検討を行っていないため、テムシロリムスによるこれらの反応がその種に特異的な効果である可能性が挙げられる。しかし、申請者らはC57BL/6を用いてテムシロリムス投与実験を行っており、ICRマウスにおける肺組織像と同様の組織像が得られている。

## 第5章 総括

本研究により、テムシロリムスは肺胞上皮傷害や肺胞マクロファージの減少を引き起こすことが明らかとなった。肺胞上皮傷害は肺血管透過性や炎症細胞浸潤を増加させ、肺胞マクロファージの減少は肺サーファクタント脂質を蓄積させる。これらが、テムシロリムスによる肺の炎症を引き起こす機序と考えられた。今後、この動物モデルの有用性をさらに検討する必要がある。

## 第6章 参考文献

1. White DA, Camus P, Endo M, Escudier B, Calvo E, Akaza H, Uemura H, Kpamegan E, Kay A, Robson M, Ravaud A, and Motzer RJ. Noninfectious Pneumonitis after Everolimus Therapy for Advanced Renal Cell Carcinoma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182: 396-403, 2010.
2. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IGH, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ, and Global AT. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine* 356: 2271-2281, 2007.
3. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Gruenwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A, and Grp R-S. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 372: 449-456, 2008.
4. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, III, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnant M, Pritchard KI, Lebrun F, Beck JT, Ito Y, Yardley D, Deleu I, Perez A, Bachelot T, Vittori L, Xu Z, Mukhopadhyay P, Lebwohl D, and Hortobagyi GN. Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 366: 520-529, 2012.
5. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EGE, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Oberg K, and T RADANT. Everolimus for Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *New England Journal of Medicine* 364: 514-523, 2011.
6. Krueger DA, Care MM, Holland K, Agricola K, Tudor C, Mangeshkar P, Wilson KA, Byars A, Sahmoud T, and Franz DN. Everolimus for Subependymal Giant-Cell Astrocytomas in Tuberous Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 363: 1801-1811, 2010.
7. Bissler JJ, Kingswood JC, Radzikowska E, Zonnenberg BA, Frost M, Belousova E, Sauter M, Nonomura N, Brakemeier S, de Vries PJ, Whittamore VH, Chen D, Sahmoud T, Shah G, Lincy J, Lebwohl D, and Budde K. Everolimus for

angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangioliomyomatosis (EXIST-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 381: 817-824, 2013.

8. **Champion L, Stern M, Israel-Biet D, Mamzer-Bruneel MF, Peraldi MN, Kreis H, Porcher R, and Morelon E.** Brief communication: Sirolimus-associated pneumonitis: 24 cases in renal transplant recipients. *Annals of Internal Medicine* 144: 505-509, 2006.
9. **Weiner SM, Sellin L, Vonend O, Schenker P, Buchner NJ, Flecken M, Viebahn R, and Rump LC.** Pneumonitis associated with sirolimus: clinical characteristics, risk factors and outcome- a single-centre experience and review of the literature. *Nephrology Dialysis Transplantation* 22: 3631-3637, 2007.
10. **Pham PTT, Pham PCT, Danovitch GM, Ross DJ, Gritsch HA, Kendrick EA, Singer J, Shah T, and Wilkinson AH.** Sirolimus-associated pulmonary toxicity. *Transplantation* 77: 1215-1220, 2004.
11. **Chhajed PN, Dickenmann M, Bubendorf L, Mayr M, Steiger J, and Tamm M.** Patterns of pulmonary complications associated with sirolimus. *Respiration* 73: 367-374, 2006.
12. **Howard L, Gopalan D, Griffiths M, and Mahadeva R.** Sirolimus-induced pulmonary hypersensitivity associated with a CD4 T-cell infiltrate. *Chest* 129: 1718-1721, 2006.
13. **Sara A-G, Hamdan A-J, Hanaa B, and Nawaz KA.** Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia: Pathogenesis, clinical features, imaging and therapy review. *Annals of Thoracic Medicine* 3: 67-75, 2008.
14. **Mukhopadhyay S, and Gal AA.** Granulomatous Lung Disease An Approach to the Differential Diagnosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 134: 667-690, 2010.
15. **Marchiori E, Zanetti G, Mano CM, and Hochhegger B.** Exogenous lipid pneumonia. Clinical and radiological manifestations. *Respiratory Medicine* 105: 659-666, 2011.
16. **Wu LC, Birle DC, and Tannock IF.** Effects of the mammalian target of rapamycin inhibitor CCI-779 used alone or with chemotherapy on human prostate cancer cells and xenografts. *Cancer Research* 65: 2825-2831, 2005.
17. **Leconte M, Nicco C, Ngo C, Chereau C, Chouzenoux S, Marut W, Guibourdenche J, Arkwright S, Weill B, Chapron C, Doussat B, and Batteux F.** The mTOR/AKT Inhibitor Temsirolimus Prevents Deep Infiltrating Endometriosis in Mice. *American Journal of Pathology* 179: 880-889, 2011.

18. **Baldan A, Gomes AV, Ping P, and Edwards PA.** Loss of ABCG1 results in chronic pulmonary inflammation. *Journal of Immunology* 180: 3560-3568, 2008.
19. **Forbes A, Pickell M, Foroughian M, Yao L-J, Lewis J, and Veldhuizen R.** Alveolar macrophage depletion is associated with increased surfactant pool sizes in adult rats. *Journal of Applied Physiology* 103: 637-645, 2007.
20. **Verheye S, Martinet W, Kockx MM, Knaapen MWM, Salu K, Timmermans J-P, Ellis JT, Kilpatrick DL, and De Meyer GRY.** Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. *Journal of the American College of Cardiology* 49: 706-715, 2007.
21. **Martinet W, Verheye S, and De Meyer GRY.** Everolimus-induced mTOR inhibition selectively depletes macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. *Autophagy* 3: 241-244, 2007.
22. **Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SWA, van der Kooij SW, Paul LC, Daha MR, and van Kooten C.** Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages. *Blood* 98: 174-180, 2001.
23. **Strieter RM.** Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia - The whole story or the last chapter of a long novel. *Chest* 128: 526S-532S, 2005.
24. **Cordier JF.** Cryptogenic organising pneumonia. *European Respiratory Journal* 28: 422-446, 2006.
25. **Nakamura H, Fujishima S, Waki Y, Urano T, Sayama K, Sakamaki F, Terashima T, Soejima K, Tasaka S, Ishizaka A, Kawashiro T, and Kanazawa M.** PRIMING OF ALVEOLAR MACROPHAGES FOR INTERLEUKIN-8 PRODUCTION IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152: 1579-1586, 1995.
26. **Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, Boomershine CS, Ortiz C, Sherrill TP, McMahon FB, Gleaves LA, Blackwell TS, and Lawson WE.** TGF beta signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 300: L887-L897, 2011.
27. **Zhang H, Berel D, Wang Y, Li P, Bhowmick NA, Figlin RA, and Kim HL.** A Comparison of Ku0063794, a Dual mTORC1 and mTORC2 Inhibitor, and Temsirolimus in Preclinical Renal Cell Carcinoma Models. *Plos One* 8: 2013.



28. **Bruns CJ, Koehl GE, Guba M, Yezhelyev M, Steinbauer M, Seeliger H, Schwend A, Hoehn A, Jauch KW, and Geissler EK.** Rapamycin-induced endothelial cell death and tumor vessel thrombosis potentiate cytotoxic therapy against pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* 10: 2109-2119, 2004.
29. **Barilli A, Visigalli R, Sala R, Gazzola GC, Parolari A, Tremoli E, Bonomini S, Simon A, Closs EI, Dall'Asta V, and Bussolati O.** In human endothelial cells rapamycin causes mTORC2 inhibition and impairs cell viability and function. *Cardiovascular Research* 78: 563-571, 2008.
30. **Singleton PA, Mambetsariev N, Lennon FE, Mathew B, Siegler JH, Moreno-Vinasco L, Salgia R, Moss J, and Garcia JG.** Methylnaltrexone potentiates the anti-angiogenic effects of mTOR inhibitors. *Journal of angiogenesis research* 2: 5-5, 2010.
31. **Madala SK, Maxfield MD, Davidson CR, Schmidt SM, Garry D, Ikegami M, Hardie WD, and Glasser SW.** Rapamycin Regulates Bleomycin-Induced Lung Damage in SP-C-Deficient Mice. *Pulmonary medicine* 2011: 653524-653524, 2011.
32. **Fielhaber JA, Carroll SF, Dydensborg AB, Shourian M, Triantafillopoulos A, Harel S, Hussain SN, Bouchard M, Qureshi ST, and Kristof AS.** Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Augments Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury and Apoptosis. *Journal of Immunology* 188: 4535-4542, 2012.
33. **Mizuno R, Asano K, Mikami S, Nagata H, Kaneko G, and Oya M.** Patterns of Interstitial Lung Disease During Everolimus Treatment in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 42: 442-446, 2012.
34. **Inoue Y, Barker E, Daniloff E, Kohno N, Hiwada K, and Newman LS.** Pulmonary epithelial cell injury and alveolar-capillary permeability in berylliosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 156: 109-115, 1997.
35. **Sorensen GL, Husby S, and Holmskov U.** Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology* 212: 381-416, 2007.
36. **Baker AD, Malur A, Barna BP, Ghosh S, Kavuru MS, Malur AG, and Thomassen MJ.** Targeted PPAR gamma deficiency in alveolar macrophages disrupts surfactant catabolism. *Journal of Lipid Research* 51: 1325-1331, 2010.
37. **Borie R, Danel C, Debray MP, Taille C, Dombret MC, Aubier M, Epauld R, and Crestani B.** Pulmonary alveolar proteinosis. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 20: 98-107, 2011.

38. **Trapnell BC, Whitsett JA, and Nakata K.** Pulmonary alveolar proteinosis. *New England Journal of Medicine* 349: 2527-2539, 2003.
39. **Wislez M, Spencer ML, Izzo JG, Juroske DM, Balhara K, Cody DD, Price RE, Hittelman WN, Wistuba, II, and Kurie JM.** Inhibition of mammalian target of rapamycin reverses alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic K-ras. *Cancer Research* 65: 3226-3235, 2005.
40. **Saito Y, Kunugi S, Suzuki Y, Narita K, Miura Y, Minegishi Y, Kimura G, Kondo Y, Azuma A, Fukuda Y, and Gemma A.** Granuloma-forming Interstitial Pneumonia Occurring One Year after the Start of Everolimus Therapy. *Internal Medicine* 52: 263-267, 2013.
41. **Sakamoto S, Kikuchi N, Ichikawa A, Sano G, Satoh K, Sugino K, Isobe K, Takai Y, Shibuya K, and Homma S.** Everolimus-induced Pneumonitis after Drug-eluting Stent Implantation: A Case Report. *Cardiovascular and Interventional Radiology* 36: 1151-1154, 2013.
42. **Cooper MH, Gregory SH, Starzl TE, and Wing EJ.** RAPAMYCIN BUT NOT FK506 INHIBITS THE PROLIFERATION OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES INDUCED BY COLONY-STIMULATING FACTORS. *Transplantation* 57: 433-439, 1994.
43. **Exposito V, Vazquez de Prada JA, Gomez-Roman JJ, Gonzalez-Vilchez F, Llano-Cardenal M, Garcia-Camarero T, Fernandez-Valls M, Ruano J, and Martin-Duran R.** Everolimus-related pulmonary toxicity in heart transplant recipients. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 27: 797-800, 2008.
44. **Papiris SA, Triantafillidou C, Kolilekas L, Markoulaki D, and Manali ED.** Amiodarone Review of Pulmonary Effects and Toxicity. *Drug Safety* 33: 539-558, 2010.
45. **Imokawa S, Colby TV, Leslie KO, and Helmers RA.** Methotrexate pneumonitis: review of the literature and histopathological findings in nine patients. *European Respiratory Journal* 15: 373-381, 2000.
46. **Malur A, McCoy AJ, Arce S, Barna BP, Kavuru MS, Malur AG, and Thomassen MJ.** Deletion of PPAR gamma in Alveolar Macrophages Is Associated with a Th-1 Pulmonary Inflammatory Response. *Journal of Immunology* 182: 5816-5822, 2009.
47. **Samokhin AO, Buehling F, Theissig F, and Bromme D.** ApoE-Deficient Mice on Cholate-Containing High-Fat Diet Reveal a Pathology Similar to Lung Sarcoidosis. *American Journal of Pathology* 176: 1148-1156, 2010.

48. **Saeemann MD, Haidinger M, Hecking M, Hoerl WH, and Weichhart T.** The Multifunctional Role of mTOR in Innate Immunity: Implications for Transplant Immunity. *American Journal of Transplantation* 9: 2655-2661, 2009.
49. **Domhan S, Schwager C, Wei Q, Muschal S, Sommerer C, Morath C, Wick W, Maercker C, Debus J, Zeier M, Huber PE, Abdollahi A.** Deciphering the systems biology of mTOR inhibition by integrative transcriptome analysis. *Current Pharmaceutical Design* 20: 88-100, 2014.
50. **Baetta R, Granata A, Canavesi M, Ferri N, Arnaboldi L, Bellosta S, Pfister P, and Corsini A.** Everolimus Inhibits Monocyte/Macrophage Migration in Vitro and Their Accumulation in Carotid Lesions of Cholesterol-Fed Rabbits. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 328: 419-425, 2009.
51. **Rubins JB.** Alveolar macrophages - Wielding the double-edged sword of inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167: 103-104, 2003.
52. **Hussain N, Wu FY, Zhu L, Thrall RS, and Kresch MJ.** Neutrophil apoptosis during the development and resolution of oleic acid-induced acute lung injury in the rat. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 19: 867-874, 1998.
53. **Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J, van Rooijen N, and van der Poll T.** Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167: 171-179, 2003.

## 第7章 謝辞

本研究の一部は、平成24年度 自治医科大学医学研究奨励金によって行われた。

本研究および本稿を遂行するにあたり、懇切丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました自治医科大学地域医療学系専攻泌尿性器病態学 森田辰男教授に謹んで感謝の意を表しますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究および本稿を遂行するにあたり、懇切丁寧な御指導、御助言を賜りました自治医科大学地域医療学系専攻臨床薬物治療学 藤村昭夫教授、安藤仁准教授、牛島健太郎講師に謹んで感謝の意を表しますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究および本稿を遂行するにあたり、懇切丁寧な御指導、御助言を賜りました自治医科大学地域医療学系呼吸器内科学 杉山幸比古教授、間藤尚子講師に謹んで感謝の意を表しますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるに際し、温かい御指導、御助言、御協力を頂きました自治医科大学臨床薬理学部門のスタッフの皆様に深謝致します。

本研究遂行の機会を与えていただきました自治医科大学附属さいたま医療センター小林裕前准教授に深謝致します。

最後に、本研学生活を通して惜しみない支援と多大なる理解をいただきました家族に心から感謝致します。