

論文の内容の要旨

論文題目「ブレオマイシン誘導性肺線維症に対するエブセレンの保護効果
-酸化型ジアシルグリセロールによる肺線維化の分子機構の解析-

学位申請者 矢ヶ崎 秀彦

キーワード：肺線維症、エブセレン、酸化型 DAG、PKC、ブレオマイシン

【背景】

人体の臓器の中でも肺は大気と直接接しており細菌やウイルス、化学物質等に暴露され炎症が起こりやすい臓器である。肺胞上皮細胞が傷害されると、傷害部位を修復するために肺線維芽細胞からコラーゲン等の細胞外マトリックスが産生され蓄積することで、肺の線維化が生じると考えられている。特発性肺線維症は慢性かつ進行性の経過をたどり、高度の線維化が進行して不可逆性の蜂巢肺形成を来す疾患であり、呼吸不全に陥る。本邦における本疾患患者の生存期間中央値は 35 ヶ月との報告もあり予後不良である。肺線維化発症に至る分子機構の詳細は不明であり、効果的な治療法もいまだ開発されていない。我々は脂溶性情報伝達物質であるジアシルグリセロールの酸化物（酸化型 DAG）がプロテインキナーゼ C (PKC) シグナルの過剰活性化を惹起し、肝臓の線維化を引き起こすことを明らかにした。一方、肺の線維化には酸化ストレスが関与することが判ってきており、酸化ストレスが負荷されることにより産生される酸化型 DAG が肺の線維化に重要な役割を果たしているものと考えられた。本研究では、ブレオマイシン (BLM) 誘導性肺線維症モデル動物を用いて、酸化型 DAG の肺線維化に及ぼす作用を解析した。また、酸化型 DAG の還元消去活性を有する薬剤であるエブセレン (ebselen) による肺線維化抑制作用を検討した。

【材料と方法】

肺線維症モデルは 8 週齢の C57BL/6J マウスを用い、BLM (4mg/kg) を誤嚥させ、肺内に注入することにより作成した。Ebselen はトララガントガムに懸濁し、BLM 投与前 1 週間から投与後 2 週間までの 3 週間にわたって週 5 回経口投与 (1.6 mg/kg/回) した。BLM 投与 3 日後、7 日後、14 日後に肺を採取し、中性ホルマリンで固定後、組織化学的分析用にパラフィン切片を作成した。また、一部の組織を生化学分析用に液体窒素を用いて急速冷凍した。

【結果】

シリウスレッド染色によりコラーゲン線維を染色したところ、BLM 投与群のマウス肺組織内に著明なコラーゲン線維の蓄積とともに肺胞構造の崩壊が観察された。さらに脂質過酸化反応のマーカーである 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) 染色を行ったところ、BLM を投与したマウス肺胞上皮細胞に陽性所見が観察された。また、BLM 投与後、時間経過に伴って肺組織中の酸化型 DAG の有意な増加が認められた。ウ

エスタンプロッティングによる解析の結果、BLM 投与により PKC α 及び δ のリン酸化（活性化）が亢進しており、酸化型 DAG の産生増加とともに PKC α 及び δ のリン酸化が誘導されることが明らかとなった。また、ebselen 投与により BLM 投与による酸化型 DAG 増加が有意に抑制され、肺線維化も改善した。更に ebselen 投与群では BLM 投与により誘導される PKC α 及び δ のリン酸化が有意に抑制されていた。PKC の下流シグナル経路である Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) カスケードの各分子 (Raf/MEK/ERK) のリン酸化が BLM 投与により亢進し、ebselen 投与によりリン酸化は有意に抑制された。線維化のマーカー分子である α SMA、collagen 1 の mRNA 発現は BLM 投与により著明に増加し、ebselen 投与により抑制された。線維化誘導の重要な役割を果たしている TGF- β 、TNF- α の産生は、BLM 投与により増加し、ebselen 投与により有意に減少していた。免疫組織化学による解析により TGF- β は BLM 投与により線維化を呈した肺胞の間質に局在するマクロファージに強い染色性を示す事が判明した。また、ebselen 投与により TGF- β の染色性は著明に減弱した。酸化ストレスによる肝線維化誘導に TIMP-1、IL-1 β 、IL-6、IL-10 の発現亢進が重要な役割を果たしていることが判っている。BLM 誘導性肺線維化の際のこれらの分子の発現変化をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討したが、肝線維化とは異なりこれらの分子の発現は BLM 投与による影響を受けなかった。

【考察】

BLM により誘導される肺線維化において、酸化型 DAG が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。BLM は生体内で強い酸化ストレス傷害を引き起こす薬剤として知られている。BLM により肺組織中において酸化ストレスが誘導され、その結果、DAG 分子の酸化反応が促進されたものと考えられた。また、産生された酸化型 DAG は PKC α 及び δ 分子を過剰活性化することで、PKC シグナル伝達系の下流にある MAPK カスケードの活性化が促進されていることが示唆された。MAPK カスケードの活性化に伴って TGF- β 、TNF- α の発現が誘導され、その結果、 α SMA、collagen 1 の発現が亢進し、肺の線維化が誘発されたものと考えられた。過酸化脂質還元活性を有する ebselen は、BLM 投与によって産生された酸化型 DAG を還元消去することによって、PKC α 及び δ の過剰活性化を抑制し、その結果、肺を線維化から防御しているものと推察された。

【結論】

本研究により、酸化型 DAG の産生が BLM 誘導性肺線維化の起点となっていることが明かとなった。酸化型 DAG により PKC α 及び δ の活性化、MAPK カスケードの活性化を介して TGF- β 、TNF- α の発現が誘導され、その結果、 α SMA、collagen 1 産生が増加し肺線維化に至ることが示された。過酸化脂質還元活性を有する ebselen は酸化型 DAG の産生を阻止することにより、肺線維化を抑制するものと考えられた。これらの知見は、今後、肺線維症の新たな治療法の開発に繋がることが期待される。