

(様式4)

学位論文の内容の要旨

須永浩章 印

(学位論文のタイトル)

Deranged fatty acid composition causes pulmonary fibrosis in *Elovl6*-deficient mice
(*Elovl6*欠損マウスにおける脂肪酸分画の変化は肺線維症を引き起こす)

(学位論文の要旨)

【背景と目的】特発性肺線維症 (IPF)は慢性進行性の呼吸器疾患であり、その発症機序の一つとして、肺サーファクタントタンパクの代謝異常による肺胞上皮細胞の傷害が示唆されている。肺サーファクタントはⅡ型肺胞上皮細胞で産生され、肺胞の虚脱を防ぐ役割を持つ脂質・タンパク質複合体であり、90%が脂質で構成される。その脂質の原料となるのが遊離脂肪酸であり、生体内では食事摂取および細胞質や小胞体膜における脂肪酸合成系により供給される。我々が注目した *Elongation of very long chain fatty acid 6 (Elovl6)*は小胞体に存在し、生体内に取り込まれた脂肪酸鎖長を伸長する酵素であり、脂肪酸組成の調節に重要な役割を果たしている。しかしこれまで、肺における脂質代謝と呼吸器疾患との関わりに着目した研究はほとんど行われていない。

そこで本研究では、肺線維症における *Elovl6* の発現変化と役割を検討することで、肺における脂肪酸組成の変化と肺線維症の病態形成との関連を解明することを目的とする。

【対象と方法】 C57BL/6 マウス(野生型、8 週齢、オス)にブレオマイシン(BLM)を 1mg/kg の濃度で経気道投与して、投与後 7~21 日間飼育することで肺線維症モデルを作成した。対照群として、同量の生理食塩水を経気道投与した。生理食塩水投与群、BLM 投与群のマウスから肺を摘出し、両群の肺における *Elovl6* の発現および活性を免疫組織化学染色、Real-time PCR 法および *Elongase Activity* にて比較検討した。また、ヒトの IPF 検体における *Elovl6* の発現を免疫組織化学染色によって調べた。

次に、*Elovl6* 欠損マウス、野生型マウスに生理食塩水および BLM を経気道投与して、肺組織におけるコラーゲン沈着の割合を *Sircol assay* により比較検討した。また、この各刺激群のマウス肺から脂質を抽出し、肺組織における脂肪酸分画を測定した。さらに、各刺激群のマウス肺における形質転換増殖因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)の発現量を Real-time PCR 法、アポトーシスの程度を TUNEL 染色およびウエスタンブロッティング、酸化ストレス (ROS)の程度を Nitrotyrosine 抗体による免疫組織化学染色にて比較検討した。

さらに、培養Ⅱ型肺胞上皮細胞 (LA-4) に siRNA を用いて *Elovl6* をノックダウンさせ、脂肪酸分画、アポトーシス、TGF- $\beta 1$ 発現量および ROS 産生量を同様に検討した。また、LA-4 細胞にパルミチン酸 (250 μ M)およびオレイン酸 (250 μ M)を添加し、直接的な脂肪酸分画の変化による影響について検討した。

【結果】野生型マウス肺およびヒト正常肺のⅡ型肺胞上皮細胞に Elov16 の発現を認め、BLM 投与による肺線維症マウスでは対照群マウスと比較して、著明な Elov16 の発現低下 (0.58 倍、 $p<0.01$)および活性低下 (0.75 倍、 $p<0.05$)を認めた。ヒト IPF 検体においても Elov16 の発現低下を認めた。

次に、Elov16 欠損マウスに BLM を投与すると、野生型マウスと比較して組織中コラーゲン量の著明な増加を認め(1.46 倍、 $p<0.01$)、肺線維症の増悪を認めた。この Elov16 欠損マウス肺における脂肪酸分画を測定した結果、対照群と比較してパルミチン酸分画の増加(1.19 倍、 $p<0.01$)およびオレイン酸分画の減少(0.57 倍、 $p<0.01$)を認めた。さらに、Elov16 欠損マウスの肺では野生型マウスと比較して、TGF- β 1 発現量(1.33 倍、 $p<0.05$)、活性型 Caspase3 発現量(1.68 倍、 $p<0.05$)および TUNEL 陽性細胞(1.62 倍、 $p<0.05$)の有意な増加を認めた。また、Elov16 欠損マウスのⅡ型肺胞上皮細胞において、野生型マウスと比較して ROS 産生の亢進を認めた。

次に、LA-4 細胞に Elov16 をノックダウンさせると、対照群 (siGFP 群) と比較してパルミチン酸分画の増加(1.18 倍、 $p<0.01$)およびオレイン酸分画の減少(0.87 倍、 $p<0.01$)を認め、Elov16 欠損マウスと同様の脂肪酸組成の変化を示した。また、Elov16 をノックダウンさせることで、ROS 産生、活性型 caspase3 発現(1.97 倍、 $p<0.01$)および TGF- β 1 発現量の増加(1.39 倍、 $p<0.01$)を認めた。さらに、LA-4 細胞にパルミチン酸を添加すると、同様の ROS 産生、活性型 caspase3 発現および TGF- β 1 発現量の増加を認めた。

【結語】以上の結果から、肺サーファクタントの主な生成場所であるⅡ型肺胞上皮細胞における Elov16 の発現や活性が低下することで、肺胞上皮の脂肪酸組成のバランスが変化し、酸化ストレスの増加からアポトーシスおよび TGF- β 1 の発現が誘導され、肺線維症に進展する可能性が示唆された。