

(様式4)

学位論文の内容の要旨

(矢富 正清) 印

(学位論文のタイトル)

17(R)-resolvin D1 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice
(ブレオマイシン誘発マウス肺線維症に17(R)-ResolvinD1が及ぼす改善効果に関する研究)

(学位論文の要旨)

1. 研究の背景と目的

特発性肺線維症(IPF)は予後不良の難治性呼吸器疾患であり、早急な病態解明、治療対策が求められている。IPFの病態仮説の1つとして、多系統機序説が提唱されており、IPFの病態の主座は肺胞や間質の慢性炎症とされている。その修復の過程で線維化メディエーターの不均衡が生じ、過剰な細胞外基質 (ECM) 蓄積による線維化が惹起されると考えられる。

Docosahexaenoic acid (DHA) やEicosapentaenoic acid (EPA) などの ω 3不飽和脂肪酸は、抗動脈硬化作用などをはじめとして健康によい作用を持つと言われる。ResolvinD1 (RvD1) は、DHA由来の抗炎症性脂質メディエーターであり、生体内の炎症反応を速やかに収束する特性をもつ。近年、その炎症収束に関するメカニズムが解明されつつあり、気管支喘息等の様々な炎症性疾患に対する有用性も報告されている。17(R)-ResolvinD1は、lipoxygenaseによるDHAの酸化から生理学的に産生されたRvD1のアスピリン誘導epimerであり、RvD1と同等の炎症収束生理活性を保ちつつ、エイコサノイド酸化還元酵素による早期の不活性化に抵抗し安定性にも優れる。近年、RvD1をリガンドとする受容体としてヒト好中球にG蛋白共役型受容体 (ALX/FPR2) が同定され、新たなRvD1の作用機序の解明も進んでいる。

これらの知見をもとに、我々は、間質性肺炎の病態モデルとして作成したブレオマイシン (BLM) 持続皮下注肺線維症マウスを用い、RvD1を急性炎症期に投与するprotocol 1と、線維化形成期に投与するprotocol 2で実験をデザインし、その抗炎症及び線維化形成抑制作用を検証した。

2. 実験方法

C57BL/6J系統の8~10週齢の雌マウスに対して、osmotic pumpを用いてBLMを2.5mg/bodyで7日間持続皮下注し、マウス肺線維症モデルを作成した。このモデルでは、BLM投与開始後day0よりday14までが炎症期、day14よりday28までが線維化形成期とされている。

まずprotocol 1の実験では、day0より17(R)-RvD1を2 μ g/dayで5日間連続腹腔内投与し、day14、day28で気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞数、肺組織病理学的変化、CT撮影、各種サイトカイン及び成長因子の遺伝子発現量、コラーゲン含有量を測定し、分析評価した。また、RvD1の作用機序を検証するため、ALX/FPR2のantagonistであるBoc-PLPLPを、day0より5日間 (RvD1投与と同期間)、2 μ g/dayでマウスに腹腔内投与し、day14でBALF中の炎症細胞数を

測定した。

さらにprotocol 2の実験では、RvD1が既に出来上がった肺線維化を改善するか否かを検証するため、RvD1をday21より5日間、 $2\mu\text{g/day}$ で5日間連続腹腔内投与し、day28で、BALF、肺組織を採取し、その炎症細胞数や肺組織病理学的変化、CT撮影、各種サイトカイン及び成長因子の遺伝子発現量、コラーゲン含有量を測定し解析した。

統計学的な解析は、Kruskal- Wallisにて多群の差を確認後、後検定としてMann- Whitney U検定を用いた。それぞれの検定においては、 p 値が0.05未満を統計学的に有意と評価した。

3. 結果

(1) protocol 1の実験結果は、day14ではBLM/RvD1群において、BLM/vehicle群と比較して、BALF中の好中球数の有意な減少を認め、肺組織中のIL-1 β 、TGF- β 1、CTGFの遺伝子発現量の有意な減少も認めた。またday28で、BLM/RvD1群でBALF中の好中球数、マクロファージ数の有意な減少を認め、肺組織中のtype I collagenの遺伝子発現量及び、コラーゲン蛋白の指標となるヒドロキシプロリン含有量の有意な低下、CTでBLMによる肺野の高吸収領域の改善、肺組織標本における胞隔炎やECM沈着の改善が確認された。また、BLM/RvD1群でBoc-PLPLPを投与すると、day14においてRvD1によって減少したBALF中の好中球数の反転効果が認められた。

(2) protocol 2の実験結果は、day28での各サンプルの検討では、BLM/RvD1群において、BALF中の好中球数及びマクロファージ数の有意な低下を認め、CTでの高吸収領域の改善及び肺組織中のコラーゲン含有量、胞隔炎、ECM沈着の改善が確認された。また、肺組織中のmatrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)の遺伝子発現量を測定したところ、BLM投与によって低下したMMP-9がRvD1投与によって有意に回復し、MMP-9の阻害酵素であるTIMP-1はRvD1投与によって低下傾向となることが確認された。

4. 考察

本研究におけるprotocol 1の実験結果からは、RvD1がレセプターであるALX/FPR2を介して作用すること、BLMにより惹起された好中球浸潤や炎症性サイトカインの産生増加等の急性炎症の収束を促進しつつ肺線維化形成の抑制に寄与することを示唆するものと考察された。

またprotocol 2の結果では、protocol 1と同様に、RvD1投与によって線維化の改善が認められており、一度形成された線維化病変がリバースされたことを示唆するものである。それを裏付ける結果として、RvD1投与後の、肺組織中のMMP-9の有意な改善及びTIMP-1の低下傾向を確認した。MMP-9は、主にマクロファージから産生され、マトリックス分解酵素としてコラーゲン分解作用を有する。TIMP-1はMMPの阻害酵素であり、TIMP-1がMMPより優位になるとコラーゲン分解が低下し、線維化形成が進行するとされている。この結果は、RvD1が慢性炎症の改善作用だけでなく、MMP-9回復を惹起してMMPとTIMPの不均衡を是正し、肺線維化の改善及び修復作用を有することを示唆している。

5. 結論

本研究は、RvD1の効果を組織中の遺伝子発現量の測定を中心に検討したものであるが、さらに各種サイトカインや成長因子の蛋白量発現解析、細胞実験での具体的なRvD1の作用機序の解明等、依然としてより詳細な検討の余地を残している。とはいえ本研究では、RvD1の急性炎症

期と線維化形成期に対する抗炎症効果、抗線維化効果、及び線維化改善効果を証明できたものである。特に、MMP-9の回復作用の報告は、RvD1のIPFにおける治療薬としての潜在能力を強く示唆するものである。今後、本研究の成果が新たなIPFの治療戦略の1つになり得ることを期待する。