

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

学位番号乙第 2675 号

学位申請者 : ひろ 廣 た 田 なお 直

学位審査論文 : Gene expression profiling of lung myofibroblasts reveals the anti-fibrotic effects of cyclosporine

(肺筋線維芽細胞に対するシクロスポリンの抗線維化作用とその遺伝子発現プロファイル)

著 者 : Nao Hirota, Takafumi Ito, Shuichi Miyazaki, Masahito Ebina, Sakae Homma
公 表 誌 : The Tohoku Journal of Experimental Medicine 233 (4) : 283-293, 2014

論文内容の要旨 :

特発性肺線維症 (IPF) は、原因不明な慢性進行性間質性肺炎であり、呼吸困難と呼吸機能の悪化をきたし、非常に予後不良な疾患である。組織学的には、密なコラーゲン線維と (筋) 線維芽細胞の増生を特徴とした線維芽細胞巣がみられ、この数は病勢との相関が云われている。筋線維芽細胞は紡錘、星形の形態をとり、様々な間葉系マーカーを発現する。なかでも内部に発現する、 α 平滑筋アクチン (α SMA) はもともと特徴的なものとされている。トランスフォーミング増殖因子 (TGF- β) は、筋線維芽細胞への分化を誘導し、コラーゲンなどの細胞外基質の過剰な産生により、強力な線維化促進作用を持つ。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンは、Tリンパ球を不活化することにより免疫阻害作用を示し、移植拒絶反応の予防に利用されている。いくつかの臨床試験により、シクロスポリンの線維性肺疾患に対する有効性が云われているものの、その潜在的なメカニズムは不明なままである。また最近になり、急性心筋梗塞における梗塞巣縮小作用や、ネフローゼにおけるタンパク尿抑制作用といった、従来の免疫抑制作用とは異なる新たな作用がいわれ始めている。

われわれは、シクロスポリンが肺の筋線維芽細胞に対し直接的に作用するとの仮説のもと、そのメカニズムについて、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルにより明らかにした。実験は胎児性肺線維芽細胞株 (MRC5) を用いて in vitro で行った。

線維芽細胞において、TGF- β により誘導される α SMA と I 型コラーゲンの発現は、シクロスポリン投与により濃度依存的に抑制された。これらをリアルタイム PCR 相対定量およびウエスタンブロットを用い、それぞれ mRNA 発現レベル、タンパク発現レベルについて明らかにした。また、免疫染色により、視覚的にも証明した。さらに、このときの遺伝子発現プロファイルについて、DNA マイクロアレイを用いて調べたところ、TGF- β により発現増強された遺伝子のうち、57 個の遺伝子がシクロスポリン投与により発現抑制された。その反対に、TGF- β 投与により発現抑制された遺伝子のうち、73 の遺伝子が発現増強された。おのおの発現抑制された 57 個、発現増強された 73 個の遺伝子について、Web ツールである DAVID (Database of Annotation, Visualization and Integrated

Discovery)を用い、機能的なクラス分類を行った。その結果、これらの遺伝子は自然免疫、サイトカイン相互作用、増殖因子、がんに関する経路などのカテゴリに分類された。さらに、抽出されたこれらの遺伝子のうち、線維化に関連すると報告されている遺伝子三つ (*IGFBP2*, *IDI*, *PPARG*) について、その遺伝子発現変化をリアルタイムPCR 相対定量により確認した。シクロスポリンの作用により、*IGFBP2*, *IDI* の発現は減少し、*PPARG* の発現は増加していた。

IGFBP2 は IPF 患者の肺組織で強発現しており、肺胞洗浄液でも増加していることから、その不良な予後と関係しているとされている。また、*IDI* は、TGF- β により誘導され、下流の転写因子として筋線維芽細胞の分化に関与している。シクロスポリンの投与によりこれらの発現が抑制されたことから、抗線維化作用との関連が示唆された。また、*PPARG* は TGF- β による筋線維芽細胞の分化を直接的に阻害することがいわれており、この発現増加は線維化抑制に働くとされている。シクロスポリンは *PPARG* の発現を増強することにより、抗線維化作用を示す可能性が考えられた。

これらの結果から、シクロスポリンは筋線維芽細胞における組織線維化作用を調節することにより抗線維化作用を示し、線維性肺疾患に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2675 号	氏 名	廣 田 直
学位審査担当者	主 査	川 合 眞 一
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	海 老 原 覚
	副 査	杉 山 篤
	副 査	松 瀬 厚 人
<p>学位審査論文の審査結果の要旨：</p> <p>特発性肺線維症（IPF）は原因不明の予後不良な慢性進行性間質性肺炎であり、一部の症例で cyclosporine の有効性が示唆されている。一般に、cyclosporine はカルシニューリン阻害作用により T リンパ球機能を抑制し作用するとされているが、IPF で効果を発揮するメカニズムは不明である。申請者らは、IPF では肺線維芽細胞に対し cyclosporine が直接作用するとの仮説を立て、その検証のため胎児性肺線維芽細胞株（MRC5）において DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を試みた。</p> <p>MRC5 の培養系に transforming growth factor (TGF)-β を添加すると α-smooth muscle actin と I 型コラーゲンの mRNA および蛋白発現が増加したが、その系に cyclosporine を添加すると濃度依存的に抑制された。このことは TGF-β により惹起された線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化誘導が cyclosporine により抑制されたことを示唆している。そこで、この現象における遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイで網羅的に検討した。その結果、TGF-β により発現が増強または抑制された遺伝子、加えて cyclosporine の添加によりそれらが抑制または増強した遺伝子などが多数検出された。それらの中から過去の報告で線維化に関連するとされている 3 遺伝子について詳細に検討したところ、cyclosporine は <i>IGFBP2</i> と <i>ID1</i> の mRNA 発現を減少させ、<i>PPARG</i> の発現を増加させた。これらの変化はいずれも線維化を抑制する変化であるため、cyclosporine の肺線維症の進行を抑制するメカニズムを示唆する結果である。</p> <p>申請者の発表の後、さまざまな質疑がなされた。まず、臨床的に cyclosporine の肺線維症に対する効果のエビデンスはあるのかとの質問があったが、症例報告やオープン試験が多く十分なエビデンスとは言えないとの返答であった。網羅的遺伝子解析から 3 遺伝子を選んだ根拠についても議論されたが、他の解析も必要で今後の課題である。また、臨床で使われるステロイドや tacrolimus で同様の検討はされたかとの質問があったが、ステロイドでは今回のような変化はなかったとのことである。網羅的遺伝子解析結果と PCR の結果に一部乖離があるとの指摘があったが、申請者は PCR の結果がより妥当と考えていると返答した。それに関連して DNA マイクロアレイ法の限界も指摘された。また、今回の実験では遺伝子間の相対的な変動を観察しているのみであるため、蛋白発現の検討や <i>in vivo</i> の実験に発展させるなどの必要性が指摘された。その他、記載法などの細かい指摘もあったが、申請者は全ての質問に対して、本研究の限界や今後の展望も含めて的確に返答した。以上より、本論文は肺線維芽細胞を標的とした cyclosporine の新たな作用機序を示唆した貴重な論文であり、学位に値すると評価した。</p>		