

論文内容の要旨

Pirfenidone inhibits fibrocyte accumulation in the lungs in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis

ブレオマイシン誘発肺障害モデルマウスにおけるピルフェニドンの fibrocyte 抑制効果に関する検討

背景：特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)は慢性かつ進行性に高度の線維化を来す予後不良な疾患である。IPF が線維化を来す機序としては、これまで主には肺内の fibroblast が過剰な細胞外マトリクスを産生することによると考えられてきたが、近年その機序の一つに骨髄由来 fibrocyte の関与が指摘されている。Fibrocyte は様々なケモカインにより肺へ遊走し細胞外マトリクスを過剰に産生することから肺の線維化の一因と考えられている。Fibrocyte を肺へ遊走させるケモカインとしては、特に chemokine (CC motif) ligand-2 (CCL2), CCL12, chemokine (CXC motif) ligand-12 (CXCL12)が重要とされており、CCL2 とその受容体である chemokine (CC motif) receptor-2 (CCR2)は、肺の線維化の過程において重要な役割を果たしている。肺胞マクロファージは CCL2 を産生することが知られているが、IPF の線維化に関与する可能性も指摘されている。ピルフェニドン(PFD)は、IPF 患者において肺活量減少を抑制するなどの効果が証明された新規抗線維化薬であり、様々なサイトカインやケモカインの産生を抑制するが、fibrocyte に対する作用はいまだ不明である。我々はブレオマイシン(BLM)誘発肺障害モデルマウスにおいて、PFD の fibrocyte 抑制効果を検討した。

方法：C57BL/6 マウスをコントロール群, BLM (100mg/kg) 群, PFD (300mg/kg/day) 群, BLM+PFD 併用群の 4 群に分け、浸透圧ポンプで BLM を 7 日間持続的に投与し、BLM 投与開始日から PFD を 28 日間経口投与したマウスで、肺の線維化に対する PFD の効果を評価した。次に、BLM 投与開始から PFD を 14 日間投与する予防モデルと、BLM 投与 10 日目から 21 日目まで PFD を投与する治療モデルを作成した。予防モデルにおいて、BLM 投与開始から 14 日目に肺を摘出し fibrocyte (CD45, collagen I 陽性細胞と定義)を flow cytometry で評価し、肺内の fibrocyte を定量的に評価するため免疫蛍光染色を行った。Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)で肺内のケモカインの濃度を測定し、肺内におけるケモカインの産生細胞を評価するため免疫染色を行った。肺胞マクロファージに対する PFD の効果を評価するため、気管支肺胞洗浄液中の細胞数、細胞分画を測定した。また、治療モデルにおいては BLM 投与開始から 21 日目に肺を摘出し fibrocyte を flow cytometry で評価した。さらに、BLM 投与後 14 日目に摘出した肺を 10-14 日間培養し、mesenchymal 細胞から fibrocyte を分離し(magnetic beads を用いて CD45 陽性細胞を単離)、ケモカインに対する fibrocyte の遊走能を Boyden chamber を用いて評価した。また

fibrocyte におけるケモカインレセプターの発現に対する PFD の作用を確認するため、定量的 PCR を行った。

結果：BLM 投与開始後 28 日目に摘出した肺において、HE 染色と Masson 染色で肺切片を評価したところ、コントロール群では線維化を認めなかったが、BLM 群では胸膜直下有意に線維化と肺胞構造の破壊を認め、PFD 併用群では抑制された。線維化を定量的に評価するため Ashcroft score と collagen assay を検討したところ、BLM による線維化が PFD を併用することで有意に抑制された ($p < 0.0001$, $p = 0.0012$)。予防モデルでは、flow cytometry による評価で fibrocyte がコントロール群の 7.5% から BLM 群では 26.5% と増加し、PFD 併用群で 13.7% まで減少した。CD45, collagen I による免疫蛍光染色での fibrocyte の定量的評価でも、PFD は有意に fibrocyte 数を抑制した ($p = 0.0097$)。また ELISA による肺内のケモカインの評価では、BLM により CCL2, CCL12 とともにコントロール群に比べ有意に上昇し、PFD 投与にて有意に抑制された ($p = 0.0003$, $p < 0.0001$)。CXCL12 は BLM により上昇し、PFD 投与により抑制される傾向にあったが、有意差は認められなかった。肺内での CCL2 産生細胞を評価した免疫染色では、BLM 群において II 型肺胞上皮細胞、肺胞内マクロファージ、細気管支上皮において陽性所見を認め、これらは PFD 投与により抑制される傾向にあった。また、PFD は気管支肺胞洗浄液中のマクロファージを減少させた。治療モデルにおいて、fibrocyte はコントロール群の 10.1% から BLM 群の 25.6% へと増加し、PFD 併用群で 17.6% まで減少した。また、BLM 投与後 14 日目に摘出した肺を培養し分離した fibrocyte を用いた遊走能の検討では、CCL2 200ng/ml, 500ng/ml により fibrocyte の遊走が認められ、PFD 投与により有意に抑制された ($p = 0.0232$, $p = 0.0025$)。また単離 fibrocyte における CCR2 の発現は、PFD 投与により有意に抑制された ($p = 0.0329$)。

結論：PFD は BLM 誘発肺障害モデルマウスにおける肺内 fibrocyte を抑制し、これには PFD の CCL2, CCL12, CCR2 抑制作用や、CCL2 による fibrocyte の遊走を抑制する作用が関与していると考えられた。Fibrocyte の抑制は、PFD の抗線維化作用の一つと考えられた。

日本医科大学大学院 内科学分野 呼吸器感染腫瘍部門
大学院生 猪俣 稔

Respiratory Research 2014 Feb 8;15(1):16.