

論文内容の要旨

Increased CTGF expression in alveolar epithelial cells
by cyclic mechanical stretch: Its mechanism and the
therapeutic effect of pirfenidone

周期的機械的伸展刺激による肺胞上皮細胞における
CTGF の発現亢進：そのメカニズムとピルフェニド
ンの治療効果

日本医科大学大学院医学研究科 呼吸器内科学分野

大学院生 青山 純一

Respiratory Physiology & Neurobiology

Volume 317, November 2023, 104142

【背景】

肺は、呼吸運動など様々な周期的伸展刺激（cyclic mechanical stretching：CMS）を受けている。CMS は様々な臓器や細胞の線維化を促進し、肺線維症の病態生理に関与している可能性が報告されている。結合組織成長因子（connective tissue growth factor：CTGF）は、組織の発生と恒常性の維持に強く関与するシステインリッチ分泌タンパク質の一つであり、肺では、線維芽細胞、内皮細胞、I型肺胞上皮細胞において、その発現が報告されており、特発性肺線維症患者の肺組織でも CTGF が増加していることが報告されている。抗 CTGF 抗体である pamrevlumab は、第 II 相臨床試験で有望な抗線維化効果が示されている。一方で、肺組織における CMS と CTGF の関係については、まだ不明な点も多い。本研究ではマウスの肺組織における CMS 後の CTGF 発現を確認し、ヒト II 型肺胞上皮細胞株・A549 を用いて関連するシグナル伝達経路を解析、さらに抗線維化薬である pirfenidone の CTGF 発現に対する効果も併せて検討した。

【方法】

11 週齢の雄の SPF C57BL/6 マウスを使用し、小動物実験用人工呼吸器・KN-58（夏目製作所）で機械換気（1 回換気量 50mL/kg、換気回数 80 回/分）による肺過伸展を 2 時間行い、直後に肺を摘出して肺組織の mRNA 及びタンパク質解析、さらに CTGF の免疫染色を実施した。

In vitro では、ヒト II 型肺胞上皮細胞株・A549 を STB-140 stretcher system（ストレッチス株式会社）により CMS を行い、RT-PCR、Western blotting、ELISA 法にて、各遺伝子、蛋白質、転写因子の発現を比較・検討した。さらに pirfenidone 存在下でも同様の検討を行った。

【結果】

マウス肺の過伸展を行うことで、CTGF の mRNA とタンパク質がコントロール群に比較して有意に増加した。また、肺胞上皮全体で CTGF 発現が増強することを免疫染色で確認した。

A549 細胞に対する 2 時間の CMS 後、コントロール群と比較して CTGF の mRNA が有意に増加、6 時間の CMS にてタンパク質の増加を ELISA 法で確認した。転写因子である Egr-1 と c-FOS は、コントロール群に比べ 30 分の CMS にて、mRNA の有意な増加、15 分の CMS にて Egr-1 の発現、c-FOS のリン酸化について、それぞれ有意な増加を確認した。

Egr-1 を siRNA でノックダウンすると 2 時間の CMS にて、CTGF の mRNA 発現が有意に抑制され、タンパク質も 6 時間の CMS において同様に抑制された。一方で、FOS 阻害剤(T5224)や、siRNA による FOS のノックダウンはいずれも CMS による CTGF の mRNA 発現に明らかな影響を及ぼさなかった。

CMSには様々なシグナル伝達経路が関連することが報告されているが、MEK-ERK経路は代表的な経路の1つである。MEK1/2のリン酸化はCMSの15分後に有意な発現が確認されたが、ERK1/2のリン酸化については確認できなかった。そこで、MEK阻害剤(U0126)を投与すると、CMSに伴うCTGF、Egr-1、c-FOSのmRNAの発現上昇を有意に抑制、さらにMEK1/2のリン酸化の抑制、Egr-1のタンパク質についても同様に発現の抑制を確認した。

最後に、pirfenidoneの効果についても検討を行った。2時間のCMSにおいて、pirfenidone投与群ではCTGFのmRNAおよびタンパク質の発現がコントロール群と比較して有意に抑制された。さらに、pirfenidone投与群でMEK1/2のリン酸化、およびEgr-1のmRNA、およびタンパク質の発現上昇が、有意に抑制された。

【考察】

マウスの肺に対する過伸展により、肺胞上皮細胞においてCTGFのタンパク質発現が増加した。また、A549細胞に対する2時間、6時間のCMSにおいて、CTGFのmRNAおよびタンパク質と共に有意に増加することが明らかになった。この増加はMEK経路と転写因子であるEgr-1によって媒介されることが分かった。今回の、CMSによる肺胞上皮細胞におけるEgr-1の増加とCTGFの発現の関係については初めての報告である。さらに、pirfenidoneの新規作用の1つとして、MEKのリン酸化とEgr-1の発現抑制を介して、CMSに伴うCTGFの発現増加を有意に抑制することも示された。

【結論】

特発性肺線維症における線維化の進行には、呼吸運動や肺胞の伸展刺激が関与している可能性がある。CTGFは線維化を促進する因子の一つであり、有望な治療標的であると考えられる。