

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

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, 2023 掲載
doi.org/10.1016/j.resp.2023.104142

肺組織は、呼吸運動等の周期的伸展刺激 (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、肺線維症の病態への関与が示唆されている。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 1 つであり、肺線維芽細胞、肺内皮細胞、I 型肺胞上皮細胞での発現に加えて、肺線維症患者の肺組織での発現上昇が報告されている。さらに、抗 CTGF 抗体パムレブルマブは、第 II 相臨床試験において、特発性肺線維症に対して有効な抗線維化効果が示された。しかしながら、肺組織における CMS と CTGF の関係については、未だに不明な点も多い。申請者は、マウス肺組織および肺胞上皮細胞における CMS 後の CTGF 発現と関連するシグナル伝達経路及び抗線維化薬ピルフェニドンの効果を評価することを目的に研究を施行した。

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) での機械換気 (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、直後に肺組織を摘出して CTGF の mRNA、タンパク質の発現を評価した。ヒト II 型肺胞上皮細胞株 A549 に対しては、STB-140 stretcher system (ストレックス株式会社) を用いて、CMS 後の CTGF と関連する遺伝子、タンパク質の発現評価とピルフェニドンの効果を検討した。

マウス肺の過伸展にて、CTGF の mRNA とタンパク質発現がコントロール群に比較して有意に上昇した。さらに、肺胞上皮全体での CTGF 発現の上昇を免疫染色にて確認した。A549 細胞に対する CMS (2 時間) にて CTGF mRNA、CMS (6 時間) にて CTGF タンパク質の発現がコントロール群と比較して有意に上昇した。転写因子である Egr-1 と c-FOS は、CMS (30 分) にて Egr-1 と c-FOS の mRNA、CMS (15 分) にて Egr-1 と c-FOS リン酸化の有意な発現上昇が認められた。siRNA を用いた Egr-1 発現抑制にて、CMS (2 時間) にて CTGF の mRNA 発現、CMS (6 時間) にて CTGF タンパク質の発現が有意に抑制された。一方で、

siRNA を用いた FOS 抑制および FOS 阻害薬 (T5224) は、CMS による CTGF の mRNA 発現に明らかな変化を及ぼさなかった。CMS の代表的なシグナル伝達経路の MEK-ERK 経路において、CMS (15 分) にて MEK1/2 リン酸化が有意に上昇した。さらに、MEK 阻害薬 (U0126) 投与は、MEK1/2 リン酸化、Egr-1 発現抑制とともに、CMS に伴う CTGF、Egr-1、c-FOS の mRNA 発現上昇を有意に抑制した。ピルフェニドン投与においては、MEK1/2 リン酸化、Egr-1 の発現抑制に加えて、CMS (2 時間) による CTGF の mRNA およびタンパク質発現が有意に抑制された。

以上、マウスおよび A549 細胞に対する CMS にて、MEK 経路と転写因子 Egr-1 を介して、CTGF 発現が上昇することを明らかにした。さらに、ピルフェニドンの新規作用機序として、MEK リン酸化と Egr-1 発現抑制を介する CMS に伴う CTGF 発現上昇の抑制作用を示した。CTGF は線維化促進因子であり、肺線維症における有望な新規治療標的であると考えられた。

第二次審査では、進展刺激の大きさと CTGF の発現の関係、マウス肺組織における CTGF の発現分布、薬剤性肺障害の発生機序との相違、他のシグナル経路の関与、ピルフェニドンの作用機序、CTGF を標的とした新規治療薬などの臨床応用の可能性、などに関する幅広い質疑が行われ、いずれも的確な回答が得られた。

本研究は、肺線維症の発生機序に関する新たな知見および新規治療法開発の可能性など今後の臨床応用が期待される意義ある論文と考えられた。

以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。