

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	Wei Yangxuan
論文審査担当者	主査 菅野 祐幸 副査 田 渕 克 彦・柴 祐 司
論文題目	Adrenomedullin ameliorates pulmonary fibrosis by regulating TGF-β-Smads signaling and myofibroblast differentiation (アドレノメデュリンは、TGF- β -Smads 経路と筋線維芽細胞の分化を調節することにより、肺線維症を改善する)
〔背景〕	<p>肺線維症は、肺の構造と機能を不可逆的に破壊し、しばしば致命的な結果をもたらす疾患である。アドレノメデュリン (AM) は抗炎症、臓器保護作用など多彩な作用を有する生理活性ペプチドであり、その活性は主として、AM の受容体 CLR に結合する受容体活性調節タンパク RAMP2 あるいは RAMP3 によって制御されている。我々は、AM あるいは RAMP2 ノックアウトマウスが、血管の発達不全により胎生致死となることを報告し、血管の発達・恒常性維持における AM-RAMP2 システムの重要性を報告してきた。一方、AM、RAMP2 は肺においても高発現しているが、その意義については不明である。本研究では、AM と RAMP2 ヘテロノックアウトマウス (+/-) を用いて、ブレオマイシン (BLM) 誘発マウス肺線維症モデルを作成し、肺における AM-RAMP2 系の病態生理学的意義を検討した。</p>
〔方法と結果〕	<p>10 週齢 AM +/-、RAMP2 +/- の雄マウスに対して、ブレオマイシン (2mg/kg) の気管内投与を行い、肺線維症モデルを作成した。AM +/- では、肺重量、肺のヒドロキシプロリン含有量、肺線維症の重症度を示すアシュクロフトスコアが野生型マウスと比較して有意に上昇した。BLM 投与後 3 日目の急性期では、FACS 分析により、AM +/- において、肺に浸潤した好酸球、単球、および好中球の有意な増加が示された。14 日目の慢性期では、遺伝子発現解析により、AM +/- では線維化関連因子の有意な上昇が認められた。各種免疫組織染色においても、AM +/- では、急性期の炎症所見と慢性期の線維化所見の増悪が確認された。同様の所見は、RAMP2 +/- でも確認された。一方、外因性に AM の持続投与を行ったところ、これらの炎症と線維化の双方の所見が改善された。</p> <p>TGF-β-Smads 経路は、組織線維化など多彩な作用を有する。最近、microRNA がこの経路の調節に関与していることが報告されている。BLM で処理された AM +/- の肺では、野生型と比較して、TGF-β の発現に変化を認めないのに対し、受容体活性型 Smad (Smad3) が有意に活性化されており、抑制性 Smad (Smad7) の発現が有意に低下していた。さらに、線維化の促進に関与するとされる micro RNA (miR-21) の発現が有意に亢進していた。</p> <p>次に、野生型マウスおよび AM +/- マウスの肺より線維芽細胞を初代培養して検討を進めた。アクチン染色、α SMA 免疫染色、Ki67 免疫染色、および形態によって、細胞を fibroblast (Fb), proto-myofibroblast (proto-MyoFb), proliferating myofibroblast (p-MyoFb), nonproliferating myofibroblast (non-p-MyoFb) の 4 種類に分類した。TGF-β 刺激を行った AM +/- 由来細胞は、野生型と比較して、non-p-MyoFb の出現が有意に亢進していた。AM +/- 由来細胞は、細胞のサイズが大きく、細胞増殖能と遊走能が低下しており、細胞収縮能が亢進していた。さらに AM +/- 由来細胞は、細胞外マトリックス産生能と、ケモカイン産生能が高い一方で、間葉系幹細胞のマーカーである Meflin の発現は著明に低下していた。</p> <p>miR21 は Smad7 の発現を抑制し、Smad7 は Smad3 の活性化を抑制することが報告されている。実際に、AM +/- 由来細胞では、野生型と比較して、TGF-β 刺激時の miR21 の発現が亢進し、Smad7 発現が低下し、Smad3 活性化が亢進していた。AM を投与するとこれらの差はキャンセルされた。TGF-β 1 型受容体阻害剤である SB431542、Smad3 阻害剤である SIS3、あるいは miR21 阻害剤の投与によって、AM +/- 由来細胞における non-p-MyoFb 出現は抑制された。このことから、AM-RAMP2 システムは、miR21-TGF-β-Smad3 経路を抑制し、non-p-MyoFb の分化を抑制することで肺線維症の進行に抑制的に働くと考えられた。</p> <p>以上の結果から、AM-RAMP2 系は、BLM 肺線維症モデルにおいて、急性期の炎症の抑制に加えて、miR21 発現を抑制し、Smad3 のリン酸化を抑制することで、TGF-β-Smad 経路を抑制し、線維芽細胞の非増殖性筋線維芽細胞 (nonproliferating myofibroblast) への分化を抑制することで、肺線維症の病態を改善することが明らかとなった。AM-RAMP2 系は、肺線維症の新たな治療標的としての応用が期待される。</p>