

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790756

研究課題名（和文）肺線維症発症機構におけるロイコトリエンの役割の解析と薬物治療効果の検討

研究課題名（英文）The role of Leukotrienes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis

研究代表者

新堀 智子 (SHIMBORI CHIKO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：40437554

研究成果の概要（和文）：本研究の実施により、CysLTs (Cysteinyl leukotrienes) が肺線維症の発症進展に重要な役割を果たしていることが示された。特に線維化の発症よりはむしろ慢性期の進行性線維化に CysLTs がより強く関与していることが示唆された。また CysLT₁R 拮抗薬の肺線維症治療薬としての可能性も示され、その基礎・臨床医学的価値は極めて高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have shown that CysLTs (Cysteinyl leukotrienes) are play important role in the pathogenesis of pulmonary fibrosis in mice model. Especially, CysLTs contribute to the directly to the progression of pulmonary fibrosis, especially in the chronic phase. Furthermore, it is expected that CysLT₁ receptor antagonist may become new therapeutic agent for human pulmonary fibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,000,000	300,000	1,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：ロイコトリエン

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺線維症と leukotrienes (LTs)

肺線維症は肺の線維化が慢性的に進行する難治性疾患であり、確実な治療法がなく、病態の解明ならびに新しい治療法の開発が急務である。一方、ロイコトリエン (LTs; CysLTs, LTB₄) はごく微量で多彩な生理活性作用を呈する脂質メディエーターである。これまでに、肺線維症患者の肺胞洗浄液 (BALF) 中および肺組織中で LTs が上昇していることが報告さ

れている。また、in vitro の研究からは LTs が肺線維芽細胞の増殖、分化、遊走などを直接活性化するとともに、線維化に重要な役割を果たすサイトカインである TNF- α や TGF- β の産生を誘導することも報告されている。以上のことから、LTs は肺の線維化においても重要な役割を果たしており、肺線維症の治療の重要なターゲットとなりうると考えられる。一方、CysLTs の受容体として CysLT₁R と CysLT₂R が、LTB₄ の受容体として BLT₁ と BLT₂ がそれぞれ知られている。CysLT₁R 拮抗薬の投与により、プレオマイシン誘発性肺線維症

モデルマウスの線維化を抑制するとの報告がある。しかしながら、ノックアウトマウスを用いた研究では、CysLT₁R^{-/-}では肺線維症がより増悪するという、CysLT₁R 拮抗薬とは異なる結果を示している。これらの相反する結果についての理由は現在まで解明されておらず、肺線維症における CysLT₁R の役割は判然としていない。また、BLT の肺線維症における役割については未知であり、更なる解析が求められている。

(2) シリカおよびプレオマイシン誘発性肺線維症モデルマウスにおける LTs の検討

肺線維症のモデル動物としては、これまでプレオマイシン誘発性肺線維症モデルが一般的に用いられてきた。プレオマイシンモデルは、急性期の肺傷害モデルとしては非常に重要であるが、プレオマイシン投与後4週間経過後以降に自然緩解するなど、慢性期の解析には必ずしも適さない。一方、シリカ誘発性肺線維症モデルは急性炎症性反応に加え、線維化が慢性的及び不可逆的に進行するモデルであり、組織学的にも nodule の形成などヒトの病態に近い。しかしながら、このようなシリカ肺線維症モデルの有用性と利点はほとんど知られておらず、シリカ誘発性肺線維症モデルを用いた研究も非常に少ない。

我々は慢性的な線維化を呈するモデルであるシリカ誘発性肺線維症モデルマウスと、一般的なモデルであるプレオマイシン誘発性肺線維症モデルマウスの2つのモデルの特性を考慮し、解析を実施することで、ヒトの肺線維症病態をより正確に理解できると考えている。そこで、本研究計画ではこれら2つの肺線維症モデルを用いて、肺線維症の発症進展における LTs およびその受容体の動態の解析と、LTs を標的とした薬物の治療効果の検討をおこない、肺線維症における LTs の役割を明らかにすることを目指す。

2. 研究の目的

本研究ではシリカおよびプレオマイシン誘発性肺線維症モデルマウスを用いて、LTs の肺線維症における役割を明らかにし、肺線維症の有効な治療法を見いだすことを目標とする。

3. 研究の方法

上記目的の達成のために、以下の3点の解析を実施した。

(1) プレオマイシンモデルにおける CysLT₁ 型受容体拮抗薬の効果の検討

急性期モデルとしてプレオマイシンモデルを用いて CysLT₁ 型受容体拮抗薬

(Montelukast) の効果を検討する。CysLT₁ 型受容体拮抗薬の投与はプレオマイシン処置3日前から2週間後まで連日実施した。



測定項目は以下の通りである。

測定項目

- ① 肺線維症の進行度の解析(肉眼的スコアリング、ヒドロキシプロリン量の測定)
- ② 肺胞洗浄液(BALF)中の細胞数算定と炎症性細胞の分画の解析(マクロファージ、好中球、リンパ球、好酸球)
- ③ 肺組織中ならびに BALF 中のロイコトリエン(LTs)量の測定
- ④ Western Blotting 法による肺組織中の TNF- α 、TGF- β 1 の測定
- ⑤ RT-PCR 法による CysLT₁R、CysLT₂R、TNF- α 、TGF- β 1、IL1- β 、IL-6、IL-10、IL-13、IFN- γ 発現量の解析
- ⑥ 免疫組織化学染色法による CysLT₁R、CysLT₂R、TNF- α 、TGF- β 1 の発現部位と発現量の解析

(2) シリカモデルにおける経時的解析

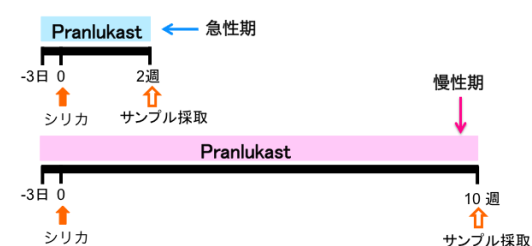
慢性期モデルであるシリカモデルを用いて CysLTs 関連指標の経時的変動を解析した。解析はシリカ処置後3, 7, 14, 28, 56日後のそれぞれに実施した。



測定項目は(1)に同じ。

(3) シリカモデルにおける CysLT₁ 型受容体拮抗薬の効果の検討

慢性期モデルであるシリカモデルにおける CysLT₁R 拮抗薬(Pranlukast) の効果を検討した。シリカ処置3日前から2週間後までの急性期のみの投与と、シリカ処置3日前から10週間後までの慢性期までの投与を実施した。



測定項目は(1)と同じ。

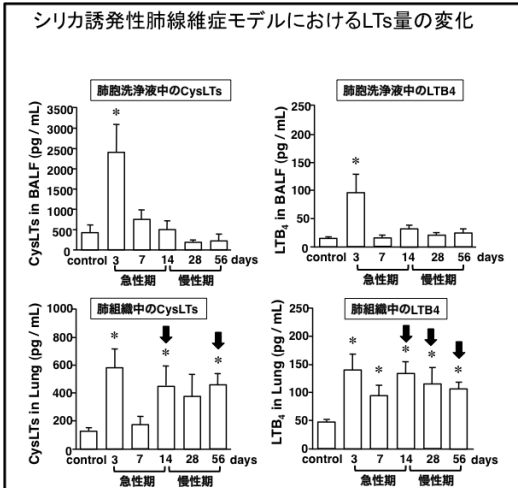
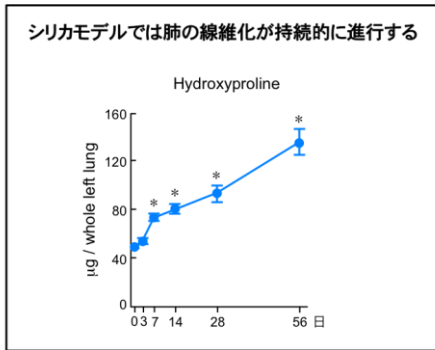
4. 研究成果

(1) プレオマイシンモデルにおける CysLT₁ 型受容体拮抗薬の効果の検討

同モデルでは線維性成分の増加とともに、肺胞洗浄液中の CysLTs 量も増加した。CysLT₁R 拮抗薬は肺繊維化および TGF- β 1 発現増加を抑制し、CysLT₂ 型受容体(CysLT₂R)の発現量低下を回復させた。この結果より、プレオマイシンによる線維化に CysLTs は重要な役割を果たし、CysLT₁R 拮抗薬は抗線維化効果を持つことが示された。

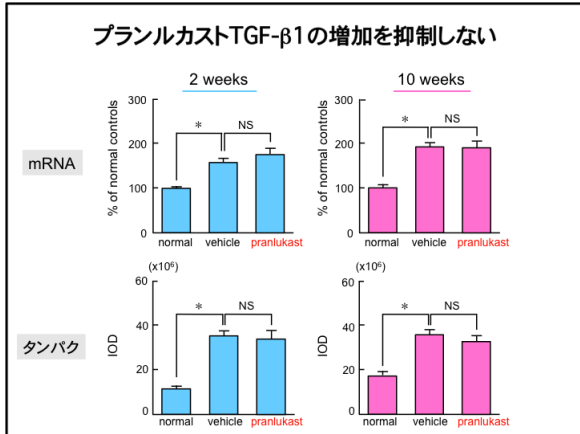
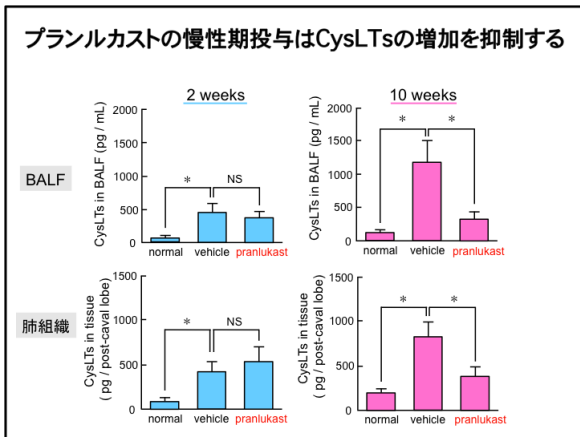
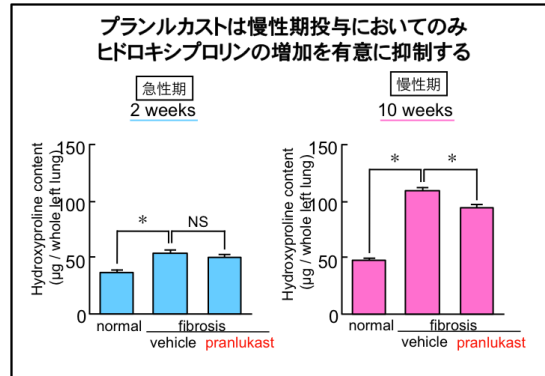
(2) シリカモデルにおける経時的解析

同モデルでは線維化の持続的進行とともに、ヒト病変に特徴的な線維性結節の形成が認められた。CysLTs 量は肺胞洗浄液中では急性期のみ増加したが、肺組織中では急性期・慢性期ともに増加した。CysLT₁R は急性期から慢性期にかけて病変部で発現増加し、CysLT₂R は発現低下していた。以上より、シリカモデルはよりヒト病変を模したモデルであることと、CysLTs が慢性期の線維化においても重要な役割を果たしている可能性が示された。



(3) シリカモデルにおける CysLT₁ 型受容体拮抗薬の効果の検討

慢性期モデルであるシリカモデルにおける CysLT₁R 拮抗薬の効果を検討した。シリカ処置 3 日前から 2 週間後までの急性期のみ投与と、シリカ処置 3 日前から 10 週間後までの慢性期までの投与を実施した。その結果、CysLT₁R 拮抗薬の 10 週間投与では線維化が有意に抑制されていたが、2 週間では抑制されなかった。また、10 週間投与においては CysLTs の産生増加が抑制されていたが、一般的な線維化の誘導因子である TNF- α 、TGF- β 1 の増加は抑制されなかった。



以上の結果から、CysLTs が肺線維症の発症進展に重要な役割を果たしていることが示された。特に線維化の発症よりむしろ慢性期の進展に CysLTs がより強く関与していることが示唆された。また CysLT₁R 拮抗薬の肺線維症治療薬としての可能性も示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Chiko Shimbori, Naotaka Shiota, Hideki Okunishi. Pranlukast, a Cysteinyl Leukotriene Type 1 Receptor Antagonist, Attenuates the Progression but Not the Onset of Silica-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. International archives of allergy and immunology. 査読有, 158, 2012, 241-251.

② Chiko Shimbori, Naotaka Shiota, Hideki Okunishi. Effects of montelukast, a cysteinyl-leukotriene type 1 receptor antagonist, on the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. European Journal of Pharmacology. 査読有, 650, 2011, 424-430.

③ Chiko Shimbori, Naotaka Shiota, Hideki Okunishi. Involvement of leukotrienes in the pathogenesis of silica-induced pulmonary fibrosis in mice. Experimental Lung Research. 査読有, 36, 2011, 292-301.

[学会発表] (計 3 件)

① 新堀智子、塩田直孝、奥西秀樹, Cysteinyl leukotriene type 1 receptor 拮抗薬はシリカ誘発性肺線維症モデルマウスにおける肺線維化の進展を抑制する 第 85 回日本薬理学会, 2012 年 3 月 16 日, 国立京都国際会館

② 新堀智子、塩田直孝、奥西秀樹, シリカ誘発性肺線維症モデルマウスにおける pranlukast の有効性の検討と cysteinyl leukotrienes の役割の解析, 第 51 回日本呼吸器学会, 2011 年 4 月 22-23 日, 誌上開催

③ 新堀智子、塩田直孝、奥西秀樹, Effect of pranlukast on the progression of silica-induced pulmonary fibrosis in mice. 第 84 回日本薬理学会, 2011 年 3 月 23 日, 誌上開催 (Journal of Pharmacological Sciences, Volume 115, Supplement 1)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新堀 智子 (SHIMBORI CHIKO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 40437554

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: