

## 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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590871

研究課題名（和文） 肺線維症における抗炎症性脂質メディエーターの有用性とその役割

研究課題名（英文） The efficacy and role of anti-lipid mediators on pulmonary fibrosis

研究代表者

福永 興彦 (FUKUNAGA KOICHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60327517

研究成果の概要（和文）：肺線維症は国が難治性疾患のひとつに指定している治療難渋な肺疾患のひとつである。今回我々は魚油に多く含まれる EPA 由来抗炎症性脂質メディエーターレゾルビン E1(RvE1)ならびに高容量 EPA をブレオマイシン誘導性マウス肺線維症モデルに投与し抗炎症効果ならびに肺線維化抑制効果を明らかにした。また高容量 EPA を投与した肺を用いて網羅的脂質解析を行ったところ RvE1 以外の脂質メディエーターが検出され、これらが抗線維化作用をもつメディエーターである可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Pulmonary fibrosis is a progressive disease of unknown etiology and poor prognosis because there is no effective therapy. In the current study, using an experimental murine model of pulmonary fibrosis, EPA derived resolving E1 (RvE1) and high dose of EPA displayed both anti-inflammatory and anti-fibrotic action. We detected the high level of different lipid mediators except RvE1 in the lungs harvested from EPA treated mice using liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based lipidomic analysis. They could be novel anti-lipid mediators against fibrotic changes in the lung.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：肺線維症、抗炎症性脂質メディエーター

## 1. 研究開始当初の背景

肺線維症は国が難治性疾患のひとつに指定している治療難渋な肺疾患のひとつである。本疾患の予後は不良であり、抗炎症作用

薬（副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤）を用いても臨床的効果はほとんどない。これまでの研究から肺線維症は炎症期と線維化期の

ふたつの過程を経て進行し、線維化期は病態の最終局面で不可逆なものと考えられてきた。しかし最近の研究によると線維化組織は一部可逆的な組織であり、この可逆性の反応を制御することで肺線維症の進行を抑制し得る可能性があることがわかった。現在肺線維症の治療として用いられる副腎皮質ステロイド、免疫抑制剤が有効な結果を得られない理由として、これらの薬剤に抗線維化作用がないためと考えられており、近年では肺線維症の治療薬開発として抗線維化作用をもつ分子が着目されている。

## 2. 研究の目的

(1) 近年生体の恒常性を保つために炎症の終息を促進する抗炎症性脂質メディエーターが着目されている。申請者はこれらメディエーターのうちオメガ3脂肪酸、なかでもエイコサペンタエン酸 (EPA) 由来の抗炎症性脂質メディエーター Resolvin E1 の肺線維症における抗炎症作用および抗線維化作用について検討した。

(2) RvE1 の前駆体である EPA を肺線維症マウスモデルに投与し抗線維化作用を検討するとともに、EPA 存在下における肺内の脂質メディエーターのプロファイルについて網羅的解析を行い検討した。

## 3. 研究の方法

(1) ブレオマイシン誘発性肺線維症モデルを用いた RvE1 の効果の検討

申請者は RvE1 の線維化期における効果について焦点をあてて本化合物の投与を行いその線維化期における役割・効果を検討した。マイクロスプレーヤーを用いてブレオマイシン (1mg/kg) 気管内投与後 14 日目から 20 日目にかけて連日 RvE1 (100ng/ mouse) を腹腔内に投与した。21 日目に気管支肺胞洗浄 (BAL) を施行し細胞数、細胞分画、サイト

カイン産生について検討をした。また肺を摘出しコラーゲン産生量、組織学的変化について検討を行った。さらに Flexi-vent®を用いて線維化後の肺機能を測定した。また RvE1 投与群と非投与群の体重変化を観察した。

(2) EPA 投与による肺線維化効果の検討ならびに肺内脂質メディエータープロファイルの網羅的解析

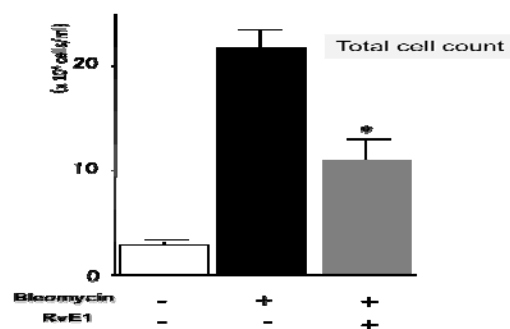
RvE1 の前駆体である EPA を高用量 (1000mg/ kg) 投与した群とコントロール群 (PBS 投与) で(1)同様ブレオマイシン肺線維症モデルを用いてコラーゲン産生量を評価しその効果を検討した。効果確認後肺内の脂質メディエータープロファイルを検討するために MS/MS を使って約 400 種類以上の脂質を検出した。

## 4. 研究成果

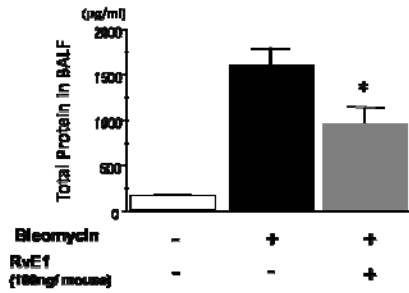
(1) RvE1 のブレオマイシン誘導性肺線維症モデルにおける効果

(1)-1 RvE1 の肺内炎症に与える効果

PBS を連日腹腔内投与したコントロールマウスに比べ RvE1 投与マウスはブレオマイシン投与 21 日目の BAL 中の炎症性細胞ならびに蛋白の減少を認めた。



(図 1 : BAL 中炎症細胞数)

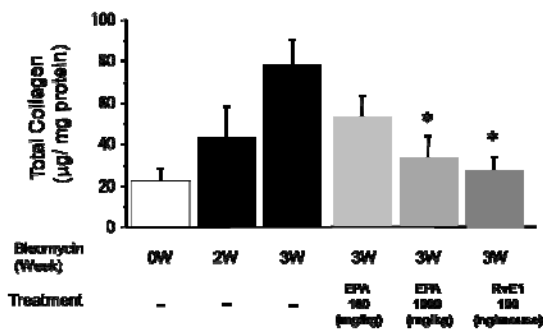


(図2 : BAL 中蛋白濃度)

さらに BAL 中の炎症性サイトカインについても ELISA 法を用いて検討したところメディエーターにおいて IL-6 および CysLTs など炎症メディエーターの抑制を認めた。

(1) -2 肺線維化期における EPA ならびに RvE1 の効果

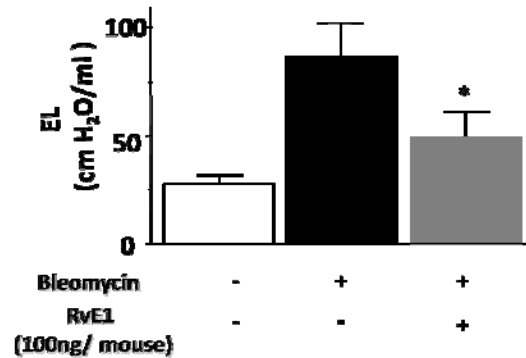
ブレオマイシン投与後 14 日目ならびに 20 日目のコラーゲン産生量を確認した。その結果 14 日目と比較し 20 日目は明らかにコラーゲン産生の増加を示した。一方で 14 日目から 20 日目まで EPA100mg/kg, 1000mg/kg あるいは RvE1 100ng/mouse を連日腹腔内投与を行ったところ EPA1000mg/kg でコラーゲン産生を抑制し、さらに RvE1 100ng/mouse ではより産生を抑制した (図3)。



(図3 : 線維化期における EPA ならびに RvE1 のコラーゲン産生に対する効果)

(1) -3 ブレオマイシン誘導性肺線維症マウスの肺機能に与える RvE1 の効果

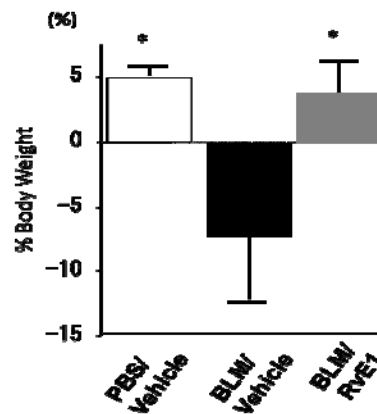
同じく 14 日~20 日に RvE1 を腹腔内投与しその後肺機能について Flexi-Vent を用いて評価した。結果 RvE1 投与群において肺機能 (Lung Elastance : EL) の改善を認めた (図4)。



(図4 : RvE1 の Lung Elastance への効果)

(1) -4 RvE1 線維化期投与による体重減少に対する効果

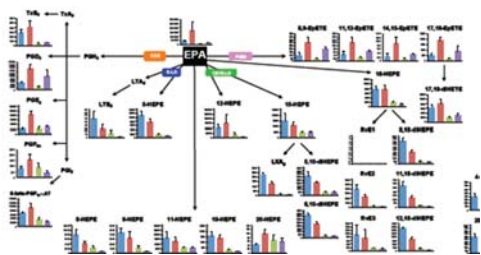
同様に線維化期 (ブレオマイシン投与後 14 ~20 日間) に連日 RvE1 を腹腔内投与したところ非 RvE1 投与群と比較し体重減少が抑制された (図5)。



(図5 : RvE1 投与による体重減少抑制効果)

(2) ブレオマイシン誘導性線維化肺における EPA 存在下の脂質メディエータープロファイル

図 3 に示したように EPA1000mg/kg 投与群においてもコラーゲン産生量の低下を認めため、高容量 EPA 投与によるブレオマイシン誘発性肺における脂肪酸代謝物のプロファイルを検討したところ RvE1 の産生は認められず、またアラキドン酸系の代謝物には影響を与えなかった。しかしレゾルビン E 系活性代謝産物である RvE2 を始めとした他の EPA 代謝産物の増加を認めた (図 6。今後の検討課題のため詳細な代謝物に関しては今回の結果では示さず。)



(図 6 :ブレオマイシン誘導性肺における EPA 由来の不飽和脂肪酸代謝マップ)

(まとめ)

抗炎症性脂質メディエーターRvE1 はマウスブレオマイシン誘発性モデルの線維化期においてその抑制効果があることが示唆された。一方高容量 EPA においても線維化期の抑制を認めたが、その機序として EPA 由来の RvE1 以外の他の活性代謝産物が産生され抗線維化作用を有している可能性が示唆された。これらの結果より RvE1 をはじめ EPA 由来の抗炎症性脂質メディエーターが肺線維化に対して有効である可能性があり、今後創薬ターゲットとして期待できる分子であると考えられた。

## 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 2 件)

1. Resolvin E1 maintains macrophage function under cigarette smoke-induced oxidative stress. Takamiya R, Fukunaga K, Arita M et al. *FEBS Open Bio* 査読あり 2012
2. The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. Fukunaga K, Seki H, Arita M, Levy BD et al. *J Immunol*. 査読あり 184(2):836-43, 2010.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福永 興彦 (FUKUNAGA KOICHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号 : 60327517

### (2) 研究分担者

浅野 浩一郎 (ASANO KOICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号 : 60192944

(2011 年度まで研究分担者として参画)

### (3) 連携研究者

有田 誠 (ARITA MAKOTO)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号 : 80292952