

主 論 文

Effects of doxycycline on production of growth factors and matrix metalloproteinases
in pulmonary fibrosis

(和訳：肺線維症におけるドキシサイクリンの成長因子、
マトリックスメタロプロテアーゼ産生に対する効果)

藤田華子, 坂本憲穂, 石松祐二, 角川智之, 原信太郎, 原 敦子, 雨森美里,
石本裕士, 永田十和子, 迎 寛, 河野 茂

(Respiration 2011 in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系 専攻
(主任指導教員：河野 茂 教授)

緒 言

特発性肺線維症 (IPF) はいまだその予後を大幅に改善する治療法がない予後不良の疾患である。IPF において、肺胞上皮細胞は、その損傷と修復の繰り返しにより病態に関与し、それに引き続く PDGF や CTGF などの成長因子や matrix metalloproteinases (MMPs) の産生亢進により線維化促進に関与している。一方、doxycycline (DOXY) は、本来の抗菌作用以外に MMPs 阻害作用を有すること、肺線維症モデルでは線維化を抑制するとの報告もあり、各種 MMPs の発現が亢進している IPF に対する効果が注目されている。しかし、その線維化抑制機序に関しては不明な点が多い。今回我々は肺線維症に対する DOXY の効果、作用機序を明らかにする目的で、肺線維症モデル、II 型肺胞上皮細胞株(A549 細胞)、肺線維芽細胞を用い、線維化に関連する各種成長因子や MMPs の産生に対する DOXY の効果について検討した。

対象と方法

1. *in vivo*: 肺線維症モデルマウスにおける検討

9 週齢の ICR マウスに bleomycin (BL) を経静脈的に 5 日間連続で投与し、BL 肺線維症モデルマウスを作成した。これらに DOXY を連日経口投与した。病理組織学的な線維化スコア、ハイドロキシプロリン定量により、肺線維化形成に対する DOXY の効果を検討した。さらに、成長因子やコラーゲン発現に対する効果について免疫染色を用いて検討した。

2. *in vitro*: A549 細胞, 肺線維芽細胞における検討

A549 細胞, 肺線維芽細胞を TGF- β 1 で刺激した際の成長因子, MMPs の発現に対する DOXY の効果を, real-time PCR, ELISA, MMP activity assay, 細胞免疫染色を用いて検討した。さらに, A549 細胞における DOXY の作用機序を検討するために, TGF- β 1 の細胞内シグナル伝達因子の 1 つである Smad2/3 について, western blotting を用いて検討した。

結 果

1. *in vivo*: 肺線維症モデルマウスにおける検討

DOXY は病理組織学的検討における肺線維化スコアを低下させ、ハイドロキシプロリンの産生を抑制し肺の線維化を抑制していた。また、免疫染色では肺組織における TGF- β 1, CTGF, collagen-1, MMP-2 の発現を抑制した。

2. *in vitro*: A549 細胞, 肺線維芽細胞における検討

A549 細胞において, DOXY は TGF- β 1 によって誘導される PDGF, CTGF, collagen-1, MMP-2, MMP-9 の mRNA 発現を抑制し, PDGF-AA, collagen-1, MMP-2 の産生を抑制したが, TGF- β 1 によって誘導されたリン酸化 Smad2/3 に対しては影響を与えなかった。一方, 肺線維芽細胞に対する効果は認めなかった。

考 察

本実験では, DOXY が, BL 肺線維症モデルにおいて線維化を抑制し, 成長因子ならびに MMP-2 の発現を抑制することを示した。また *in vitro* では肺胞上皮細胞において, PDGF, CTGF などの線維化促進成長因子, MMPs の産生を抑制することを示した。しかし, 肺線維芽細胞においてはその作用は認めなかった。このことは DOXY が, 肺胞上皮からの PDGF-A, CTGF, MMP-2 の産生を抑制することにより肺線維化を抑制することを示唆している。一方で, IPF においては, 肺胞上皮細胞が線維芽細胞や筋線維芽細胞に形質転換し線維化に関与する上皮間葉系転換(epithelial mesenchymal transition : EMT)と呼ばれる現象が注目されている。PDGF-A, CTGF, MMP-2, collagen-1 などの発現は EMT のマーカーとしても用いられており, 今回の結果は DOXY が EMT を抑制することで肺線維化を抑制している可能性も示唆している。肺胞上皮細胞に作用する機序として, TGF- β による細胞内シグナル伝達および EMT に関与するとされる Smad2, Smad3 のリン酸化を検討したが, DOXY は影響を与えなかった。DOXY は Smad 以外の経路を抑制することによって, 線維化促進因子を抑制したと考えられた。今回, *in vitro* において細胞刺激に使用した TGF- β 1 は, 肺線維症の形成において重要な役割を持つことが知られている。BL 肺線維症マウスモデルでは, DOXY が TGF- β 1 の発現を抑制しており, DOXY の線維化抑制の機序として肺胞マクロファージなどからの TGF- β 1 産生の抑制も示唆された。

近年, IPF に対する新しい治療ターゲットが解明され, 臨床試験が行われているが, 今だ, 明らかに予後を改善するものはない。DOXY の作用メカニズムは, まだ明らかでないが, 最近, IPF 患者に DOXY を長期間投与し効果が得られたとの報告もあり, 治療薬の候補として注目されている。さらなる検討が必要であるが, 本研究は, DOXY が IPF の治療法の 1 つとなりうることとその作用機序の一部を明らかにした。