

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 病態生化学研究室
職・氏名 講師・小池 敦資

研究テーマ：

肺線維症急性増悪における CD68 陽性細胞の制御機構の解明

研究期間：

2023 年 4 月 1 日 ～ 2025 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 小池 敦資（大阪医科薬科大学・薬学部・講師）

研究目的：

特発性肺線維症 (IPF) は、肺の間質に炎症や線維化をきたす原因不明の進行性疾患であり、全世界で約 300 万人が罹患している。特に 65 歳以上の高齢者に好発し、診断後の生存中央値は 3 年、5 年生存率は 20-40%と予後は極めて不良である。IPF の臨床経過において特に重要な問題となるのが「急性増悪」である。これは呼吸機能の急速かつ不可逆的な悪化を特徴とし、発症すると致死率が著しく高い危機的状态に陥る。急性増悪においては炎症反応の関与が示唆されているが、その詳細な発症機構は未だ解明されていない。本研究では、肺線維症急性増悪モデルを確立し、急性増悪の炎症発症機構を明らかにすることを目的とした。

研究内容および研究成果：

本研究では、抗腫瘍薬ブレオマイシン (BLM) とグラム陰性菌の外膜成分リポ多糖 (LPS) を組み合わせたマウスモデル (BLM + LPS) を用いて、肺線維症の急性増悪モデルを確立した。実験では、マウスに BLM (1.5 mg/kg) を経気道的に投与し、BLM 投与後 14 日目に LPS (0.5 mg/kg) を経鼻投与した後、さらに 7 日間 (合計 21 日間) 飼育した。解析項目として体重および呼吸機能を経時的に測定し、BLM 投与後 21 日目のマウスの肺を用いて組織学的解析、遺伝子・タンパク質の発現解析を行った。

体重と呼吸機能は、BLM 単独処理マウスでは、コントロールと比較して有意に低下していた。また、BLM + LPS 処理マウスでは、BLM 単独処理よりもさらに低下することが明らかとなった (図 1)。次に肺の線維化や炎症を調べたところ、BLM 単独処理と比較して BLM + LPS 処理マウスの方が、線維化および炎症が顕著に亢進していることを確認した。以上の結果より、BLM と LPS を組み合わせることで、BLM 単独処理と比較して、より重度の肺線維化および炎症が惹起されることが示唆された。そこで、本モデルを肺線維症急性増悪モデルとして以降の解析に用いることとした。

炎症の誘導機構を解明するために、肺組織における炎症関連細胞の集積を免疫組織化学的染色により評価した。その結果、BLM 処理マウスの肺では CD68 陽性マクロファージが増加し、LPS 追加処理によりさらに顕著な増加が認められた。次に、炎症性細胞死 (ネクロプトーシス) の関与を検討

するため、TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 染色を実施した。その結果、LPS 処理により BLM 投与マウスの肺における TUNEL 陽性細胞が有意に増加することが明らかとなった。また、BLM 単独および BLM + LPS 処理マウスの肺組織では、ネクロプトーシスの実行因子である MLKL (Mixed lineage kinase domain-like protein) の活性化 (リン酸化) が検出され、その発現レベルは BLM + LPS 処理群で顕著に上昇していた。これらの結果から、BLM や BLM + LPS 処理によってネクロプトーシスが誘導されることが示唆された。

さらに、CD68、リン酸化 MLKL 抗体と TUNEL 染色を組み合わせた多重蛍光免疫染色を行った結果、MLKL と CD68 陽性マクロファージの発現レベルが増加し、それらの大部分が肺組織において共局在していた。また、CD68 陽性細胞と TUNEL 陽性細胞の共染色率、および CD68 陽性細胞とリン酸化 MLKL 陽性細胞の共染色率が高値を示したことから、マクロファージにおけるネクロプトーシスが肺線維症の急性増悪に重要な役割を果たしていることが示唆された (図)。

本研究は、肺線維症急性増悪の分子メカニズムに関する新たな知見を提供し、マクロファージのネクロプトーシスを標的とした新規治療法開発の可能性を提示している。今後は、マクロファージ特異的 MLKL 欠損マウスなどを用いて、ネクロプトーシスの調節機構をさらに詳細に解析する必要がある。

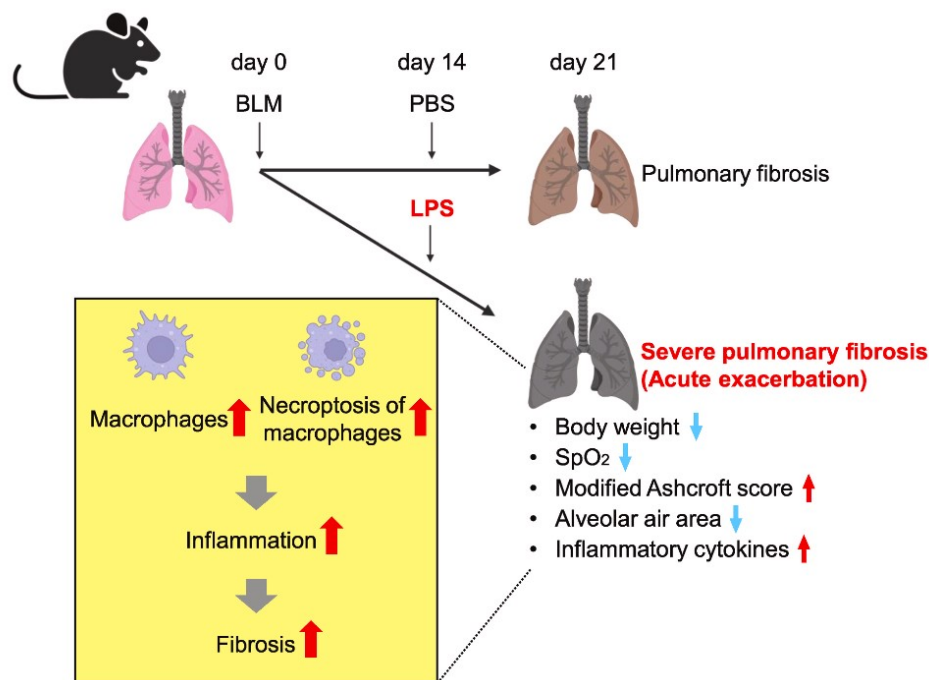


図 肺線維症急性増悪におけるマクロファージおよびネクロプトーシスの関与について

成果発表：

<原著論文>

・ Involvement of necroptotic cell death in macrophages in progression of bleomycin and LPS-induced acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Atsushi Koike, Kaoruko Hayashi, Ko Fujimori, *Eur. J. Pharmacol.*, 972, 176572, 2024