

学位論文の要旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 臨床医学系講座 呼吸器内科学分野	氏 名	おかの ともひと 岡野 智仁
-----	--	-----	-------------------

主論文の題名

Low-Dose of Intrapulmonary Pirfenidone Improves Human Transforming Growth Factor β 1-Driven Lung Fibrosis

主論文の要旨

特発性肺線維症は原因が特定されず、慢性の経過を辿りながら病勢が進行し最終的に致死的な転帰を辿る難治性呼吸器疾患である。本疾患の病態形成に関してTGF- β 1(トランスフォーミング増殖因子- β 1)、CTGF(connective tissue growth factor)、IL-13(インターロイキン-13)、IFN- γ (インターフェロン- γ)、凝固因子といった多数の因子が候補に挙げられている。TGF- β 1は特発性肺線維症における異常な組織修復過程を牽引し、細胞外マトリックスの沈着を引き起こすサイトカインである。我々はヒト由来TGF- β 1遺伝子組み換えマウスを作成し、肺の線維化を来すことを確認した。今回我々の実験ではこのマウスを特発性肺線維症の動物モデルとして用いることとした。

現在特発性肺線維症の治療で中心となるのは抗線維化薬であり、ピルフェニドンは内服で使用される薬剤である。過去の研究では本薬剤は抗酸化、抗炎症、抗線維化活性作用を示すが、特発性肺線維症に対するこれらの効果の正確な機序は不詳とされた。2008年に日本でまずピルフェニドンが保険償還されるようになり、2011年にヨーロッパ、2014年に米国でも使用が認可されるようになった。投与量は本邦では1800mg/日、欧米では2403mg/日が常用量として認可されている。複数の臨床試験で実証されたようにピルフェニドンの経口投与は努力性肺活量の低下抑制、無増悪生存期間の延長、そして全死亡率を低減することが知られている。しかしピルフェニドンは高い頻度で胃消化器症状や光線過敏症といった合併症を来し得る。これらの合併症は患者の生活の質を悪化させ、治療中断につながり得る。特発性肺線維症の治療薬は選択肢が限られており、そのため少ない合併症で既存薬剤を活用する方法を探索するというのが本研究の根幹である。肺内への薬剤投与は全身性の合併症を減少する極めて優れた戦略である。それ故にピルフェニドン吸入療法が内服療法と比較して肺線維症の病勢を同等以上に抑制出来るか関心が持たれるところである。

我々は低用量ピルフェニドンの肺内投与がヒト由来TGF- β 1による肺線維症において有効であるという仮説を立てた。本仮説を実証するために、前述の肺線維症を起こしたヒト由来TGF- β 1組み換えマウスに対して異なる用量のピルフェニドンを経口及び経鼻投与することで治療効果を比較した。

実験の詳細に触れる。まずC57BL/6マウスに微生物由来の人工染色体を用いてマウスのSP-C (surfactant protein C)の下流にヒト由来TGF- β 1遺伝子を配置した。この遺伝子改変マウスは自発的に6週齢から進行性の肺線維化を来す。今回の実験では8週齢-12週齢の雄のマウス(体重25-29g)が実験で用いられた。JAPAN SLC株式会社より同年齢・同体重のWild typeの雄マウスをコントロールとして用いた。次に内服用及び経鼻投与用のピルフェニドン懸濁液の調製並びに投与用法について述べる。内服用のピルフェニドンは0.5 %メチルセルロース溶媒を用いて作成した。今回の実験でピルフェニドン濃度はそれぞれ低用量群：3mg/ml、中間用量群：10mg/ml、高用量群：30 mg/mlとなるように調製し、経管栄養チューブを用いてマウス体重あたり10ml/kgの用量で経口投与された。経鼻投与用のピルフェニドンは生理食塩水に溶解し、濃度がそれぞれ低用量群：0.04mg/ml、中間用量群：0.12mg/ml、高用量群：0.4mg/mlとなるように調整した。イソフルレンで麻酔を掛けた状態で経鼻投与された。内服群、点鼻投与群の両群とも実験第1日から第21日目までは1日2回投与を受けた。実験第22日目のみ朝1回投与し、その後安楽死させるという流れとなった。

治療効果の評価方法について述べる。まずCT画像検査であるが3%イソフルランを用いた麻酔下で、上記ピルフェニドン投与10日前と実験第22日目で実施した。画像的な肺の線維化の程度は呼吸器専門医師によるスコアリングシステムを用いて評価した。また実験第22日目にペントバルビタールをマウス体重あたり120mg/kgを腹腔内投与して安楽死させた後に経静脈から採血及び気管支肺胞洗浄を行った。その後外科的に開胸を行い右上葉、右中葉、そして副葉を生理食塩水で灌流後、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。ホルマリン固定したこれらの肺葉はパラフィンに包埋し、ヘマトキシリン-エオジン染色とマッソントリクローム染色用の標本とし線維化の評価へ用いた。右下葉3分の2は細胞成分を機械的に破碎した後に総TGF- β 1と活性化TGF- β 1の量を測定した。残りの右下葉3分の1はマウス由来CTGF(connective tissue growth factor)、IL-6(インターロイキン-6)、IL-13(インターロイキン-13)、MCP-1(monocyte chemotactic protein-1)、IFN- γ (インターフェロン- γ)、SP-C(surfactant protein C)、マウス由来TGF- β 1とヒト由来TGF- β 1の遺伝子発現解析のため用いた。左肺は切除された後、ハイドロキシプロリンの含有量解析に用いられた。

結果として肺内の細胞浸潤、炎症及び線維化、肺線維化スコアそしてハイドロキシプロリンの含有の程度の改善が低用量ピルフェニドン・経鼻投与群と高用量ピルフェニドン・経口投与群間で同程度であったことを確認した。今回の研究ではin vivoにおいてピルフェニドンは低用量・肺内投与でもヒト由来TGF- β 1による肺線維症の抑制効果を有しており、この結果は臨床段階での特発性肺線維症患者に対するピルフェニドン吸入療法開発への説得力のある理論的根拠となる。