

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第 5 2 2 号	氏 名	岡 宏 亮
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	吉岡秀克印
		副査氏名	宮崎英士 
		副査氏名	河野康志 
<p>(論文題目) Inhibitory effects of pitavastatin on fibrogenic mediator production by human lung fibroblasts.</p> <p>(論文掲載雑誌名) Life Sciences in press</p> <p>(論文要旨) 特発性肺線維症をはじめとする進行性の線維化を呈する肺疾患は予後不良であり、未だ画期的な治療法や予防法は確立されていない。スタチンは HMG-CoA 環元酵素を阻害し、コレステロールの生合成をさせることより、広く脂質異常症に用いられている。最近、スタチンが循環器や肝などの各種臓器線維症において、抗線維化作用を示す報告がみられる。今回、申請者は正常ヒト肺線維芽細胞 (NHLF) を用いて、スタチンの肺線維症に対する抗線維化作用の可能性及びその作用機序について調べた。 正常ヒト肺線維芽細胞を培地単独、ピタバスタチン添加群、ピタバスタチン+メバロン酸 (コレステロール合成中間代謝物) 添加群に分け、これらに対し、TGF-β1 による刺激の有無で調べた。線維化の評価のパラメーターとして、予備実験をもとに CXCL8、PDGF、VEGF、collagen-1 を選び、その mRNA (Real-time PCR 法) 及びタンパク (ELISA 法、Multiplex assay 法) の測定を行った。また、TGF-β-Smad 系の関与について、Smad3 のリン酸化を ELISA 法で調べた。 まず、申請者らは、この正常ヒト肺線維芽細胞において、TGF-β1、5 及び 10 ng/ml の刺激により 24 時間後に collagen-1 の mRNA が増加することを確認した。また、その他のパラメーターも TGF-β1 の刺激により同様に増加した。この作用はピタバスタチン添加により、CXCL8 及び collagen-1 においては mRNA 及びタンパクが有意に抑制され、VEGF ではタンパクが有意に抑制された。これらの作用はさらにメバロン酸を添加することで解除された。また、ピタバスタチンは TGF-β-Smad 系における Smad3 のリン酸化を有意に抑制した。 本研究は、脂質治療薬であるスタチンがコレステロール合成経路に関連し、線維化抑制効果を示し、肺線維症の治療に役立つ可能性を示した論文であり、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第 522 号	氏 名	岡 宏 亮
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	吉岡秀克 印	
	副査氏名	宮崎英士 	
	副査氏名	河野康志 	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 「学位論文要旨」における間違い及び内容の不備について指摘があった。 2. 特発性肺線維症の線維芽細胞のフェノタイプとしてどういう知見があるのか。 3. 肺線維症にはピルフェニドン (pirfenidone : 抗線維化剤) やニンテダニブ (nintedanib, BIBF1120) のような薬が使われているがピタバスタチンに注目した理由は何か。有害事象などがあるのか。 4. ゲノムワイド解析により特発性肺線維症と関連ある SNP (一塩基多型) は知られているか。 5. 本研究で使用した細胞はどのような背景の細胞か。 6. 本研究で肺線維症患者の線維芽細胞を使用しなかったのはなぜか。 7. Fibroblast basal medium はすべての実験に対して用いたのか。 8. 線維化に関わる分子のうち、Collagen I、CXCL8、VEGF を取り上げたのはなぜか。 9. Collagen I の mRNA は$\alpha 1$、$\alpha 2$ 鎖のいずれを測定したのか。 10. VEGF についてはアイソフォームがあるため、どの大きさのタンパクを測定したのか。mRNA の定量ではエクソンのどの付近を増幅するプライマーを設定したのか。 11. Multiplex assay の結果、どのようなメディエーターが増加したのか。 12. Fig. 2e の TGF-β(-)、PTV(-)群と TGF-β(-)、PTV(+)群とで有意差はなかったのか。 13. Collagen I、CXCL8 産生に関して、PTV の dose-dependency はどうであったか。 14. Smad 3 のリン酸化の検討で、ピタバスタチンによる抑制は検討しているが、メバロン酸を加えての Smad 3 のリン酸化の回復を見ていないのはなぜか。 15. TGF-β刺激後、24 時間以降のデータはあるのか。 16. VEGF における mRNA とタンパクにおける結果の違いは代謝の違いを反映しているのではないか。 17. 本薬剤は抗線維効果を示す他の薬剤と比較して、その抗線維化作用の程度をどのように考えるか。 18. この研究を肺線維症の病態解明に発展させるために、どういう展開を考えるか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 岡 宏亮

論 文 題 目

Inhibitory effects of pitavastatin on fibrogenic mediator production by human lung fibroblasts(ヒト肺線維芽細胞を用いたピタバスタチンの抗線維化作用の検討)

要 旨

【諸言】特発性肺線維症をはじめとする、進行性の線維化を呈する肺疾患は予後不良であり、未だ画期的な治療法や予防法は確立されていない。スタチンはコレステロール合成経路の律速酵素である 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase の働きを阻害し、生合成を低下させるという薬効から、広く脂質異常症の治療に用いられている。近年、コレステロール低下作用に依存しないスタチンの多面的作用 (pleiotropic effects) に関する報告がされており、さらには、スタチンが循環器、肝など各種臓器線維症において抗線維化作用を発揮したとする報告もされている。今回、我々は、正常ヒト肺線維芽細胞 (NHLE) を用いて、スタチンが肺線維症に関しても抗線維化作用を発揮する可能性、および、その機序に関して検討を行った。

【方法】(i) ①線維化シグナルの導入は、多くの報告において、各種臓器線維化の病態に関わるとされている、TGF- β 1 を用いた。初めに TGF- β 1 刺激濃度に対する、各メディエーターの反応について検討を行った。NHLE を培地単独、TGF- β 1 (5 ng/ml) 刺激群、TGF- β 1 (10 ng/ml) 刺激群とに分けて培養し、Day 6 に刺激した。刺激 24 時間後に total RNA、培養上清を回収し、CXCL8、VEGF、collagen-1 について mRNA (real-timePCR 法)、タンパク (ELISA もしくは multiplex-assay 法使用) の測定、評価

を行った。②次に TGF- β 1 刺激時間の変化に対する、各メディエーターの反応について検討を行った。①と同様に NHLF を培養し、TGF- β 1 (5 ng/ml) による刺激 0、3、6、12、24 時間後に、mRNA、タンパクについて測定、評価をおこなった。(ii) 次に、肺線維芽細胞を培地単独、ピタバスタチン添加群、コレステロール合成における中間生成物であるメバロン酸を添加した群、およびその両者を添加した群とに分けて培養し、また、各々をさらに線維化誘導因子である TGF- β 1 で刺激した群を作成した。その後、各々の群において、予備実験の結果を参考に選択した 3 つの線維化関連メディエーター (CXCL8, VEGF, collagen-1) に関して (i) と同様に評価した。(iii) 加えて、コレステロール合成経路のより下流とメディエーター合成との関連に関して検討を行った。これまでの報告では、collagen の産生に際して重要な役割を果たすとされる TGF- β -Smad の経路の活性化に、コレステロール合成経路のエフェクターである Rho/ROCK が関わりとされている。今回、我々はこの TGF- β -Smad 経路のうち Smad3 に関して、肺線維芽細胞においてピタバスタチンによる抑制効果がみられるか否かを検討した(ELISA 法)。設定条件は、刺激時間を 12 h とした以外は (ii) と同様とした。

【結果】(i) の結果をもとに、(ii) については、TGF- β 1 は 5 ng/ml、刺激時間 24 h の設定を採用した。測定項目のうち、CXCL8、collagen-1、については TGF- β 1 単独投与群と比較して、TGF- β 1 およびピタバスタチン添加群で mRNA、タンパク両方について有意に抑制され、VEGF についてはタンパクで抑制が見られた。これらの現象に関して、メバロン酸を添加することで抑制効果の減弱が見られた。加えて、ピタバスタチン添加群では TGF- β 1 刺激後の Smad3 のリン酸化が有意に抑制された。以上のことから、ピタバスタチンはヒト肺線維芽細胞において、TGF- β 1 誘導性の線維化関連メディエーターの産生を有意に抑制し、また、その作用は同時に Smad3 のリン酸化の抑制を伴っていることが分かった。加えて、それらの作用はメバロン酸添加により解徐されたことから、この効果がコレステロール合成経路に関連してもたらされていることが分かった。

【結語】スタチンが肺線維症において線維化抑制効果を発揮する可能性が示唆された。