

【15】

氏 名	しろ もり さだ あき 城 守 貞 章
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第780号
学位授与の日付	令和3年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (先端内科学)
学位論文題目	Treatment with both Nintedanib and Steroid in Bleomycin-induced pulmonary fibrosis model mice didn't inhibit lung fibrosis (ブレオマイシン誘発肺線維症マウスモデルにおけるニンテダニブとステロイドの併用は肺線維化を抑制できなかった)
論文審査委員	(主査) 教授 倉 沢 和 宏 (副査) 教授 松 村 輔 二 教授 伴 慎 一

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis : IPF) は特発性間質性肺炎 (Idiopathic Interstitial Pneumonias : IIPs) の1つで、肺の高度な線維化を主体とし、拘束性換気障害をきたす。他のIIPsに比べて、ステロイドや免疫抑制剤に対する反応性が悪く予後不良である。インドリノン誘導体のニンテダニブ (Nintedanib) は、血管内皮細胞増殖因子受容体 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF receptor)、線維芽細胞増殖因子受容体 (Fibroblast Growth Factors : FGF receptor)、血小板由来成長因子受容体 (Platelet-Derived Growth Factor : PDGF receptor) チロシンキナーゼに対する小分子阻害薬で、抗線維化作用によりIPF患者の努力性肺活量の経年的低下に対し抑制効果が示され、2015年に保険適用となった。しかし、IPF患者に対するNintedanib投与における予後改善報告は認められない。

【目 的】

本研究では、Nintedanibに加え、ステロイド併用における肺線維化の影響を検討するために、ブレオマイシン (Bleomycin : BLM) 誘発肺線維症マウスモデルを用いて、組織学、免疫学的に解析した。

【対象と方法】

動物実験は、獨協医科大学の動物実験委員会によって承認 (第767号) され、実施した。

BLM誘発肺線維症マウスモデルは、C57BL/6マウスに対し、BLM (5mg/kg/mouse) を経気道的

に投与 (Day 1) し、肺線維化を惹起させ、Day15に、気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar Lavage : BAL) および肺組織を採取した。初めに、BLM誘発肺線維症マウスモデルに対し、BLM投与前日 (Day 0) または翌日 (Day 2) からNintedanib (3mg/kg/day) をDay13まで経食道的に投与し、Ashcroft scoreを用いた組織学的解析および、BAL洗浄中のcollagen濃度と、サイトカイン (Transforming Growth Factor : TGF- β 1、VEGF、PDGF-AA、FGF2) の濃度を其々、可溶性・不可溶性コラーゲン定量キットとEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法を用いて解析した。次に、BLM誘発肺線維症マウスモデルに対し、BLM投与前日 (Day 0) または翌日 (Day 2) からNintedanib (3mg/kg/day) とDexamethasone (0.1mg/kg/day) をDay13まで経食道的に投与し、組織学的に解析した。

【結 果】

BLM誘発前におけるNintedanib投与群では、非投与群と比較し、肺線維化スコア (2.4 ± 1.4 vs 4.9 ± 1.3) が有意 ($P < 0.01$) に低値であった。BLM誘発後におけるNintedanib投与群では、非投与群と比較し、肺線維化スコア (3.6 ± 1.5) は抑制されなかった ($P = 0.106$)。さらに、BLM誘発前におけるNintedanib投与群では、非投与群と比較し、BAL洗浄液中のcollagen (4.4 ± 3.0 $\mu\text{g/ml}$ vs 10.0 ± 6.5 $\mu\text{g/ml}$) とTGF- β 1 (95.7 ± 48.4 pg/ml vs 147.1 ± 11.7 pg/ml) 濃度も有意 ($P < 0.05$) に低値であった。一方、BLM誘発肺線維症マウスモデルに対するNintedanib投与は、BAL洗浄中のVEGF、PDGF-AA、FGF2に影響を及ぼさなかった。BLM誘発前または後におけるNintedanibとDexamethasoneの併用において、BLM誘発肺線維症マウスモデルにおける肺線維化は悪化した (3.8 ± 1.3 vs 4.6 ± 1.1)。

【考 察】

BLM誘発肺線維症マウスモデルにおいて、BLM誘発前にNintedanibを投与することによって、肺線維化は抑制され、BAL洗浄液中のcollagen濃度およびTGF- β 1濃度の抑制効果が認められた。TGF- β 1同様に、FGF2、PDGF-AAやVEGFは線維芽細胞から産生され、さらに線維芽細胞に対する強力な増殖因子であることは既に知られている。本研究では、BAL洗浄液中のFGF2は、BLM誘発肺線維症マウスモデルにおいて検出されなかった。一般に、BAL中のサイトカインは、洗浄液により希釈され検出されないことがある。このため、本研究において免疫学的染色を施行した結果、肺線維芽細胞においてFGF2の発現が認められた。これらの結果から、BLM誘発前におけるNintedanibの投与により、線維芽細胞の増殖抑制に伴い、FGF2産生も低下する可能性が考えられた。また、BAL洗浄液中のPDGF-AAとVEGFにおいて、Nintedanibの影響は認められなかった。PDGF-AAやVEGFは線維芽細胞以外にも発現することも知られている。本研究において、PDGF-AAとVEGFに対して免疫学的染色を施行した結果、血管内皮細胞、気道上皮細胞、マクロファージなどに強く発現していることが確認された。このことから、線維芽細胞から産生されるPDGF-AAとVEGFは微量なため、線維芽細胞が減少しても、BAL洗浄液中に影響を齎せなかった可能性が考えられた。さらに、本研究ではBLM誘発後のNintedanibを投与により、線維化は抑制されなかった。しかし、BLM誘発前にNintedanibを投与することによって、線維化が抑制された。BLM誘発肺線維症の発症機序として、BLMの経気道投与により、急性肺胞炎と間質の炎症を誘発させ、白血球 (好中球やリンパ球) が動

員された後、線維芽細胞の活性、増殖に続き、線維化を形成する。線維芽細胞は、一度炎症性サイトカインを含む増殖因子などで活性化されると、恒常的に増殖、線維化形成を促進する可能性が考えられた。

IPF患者におけるステロイド剤の投与については、悲観的な報告が多い。本研究では、Nintedanibとステロイドの併用による肺線維化に与える影響について解析した。その結果、BLM誘発前におけるNintedanib投与によって抑制された肺線維化は、Nintedanibとステロイドの併用により、肺線維化を抑制できなかった。このことは、ステロイドが肺線維芽細胞に作用し、Nintedanibの薬剤親和性を低下させる可能性や、ステロイドとNintedanibの薬剤間相互作用によって、抗線維化作用が減弱した可能性が考えられた。また、本研究で使用したマウスに対するステロイド投与量は、人の体重換算において中用量であり、その投与量(低用量、高用量)の違いにより、線維化形成に与える影響に対し、違いがある可能性も考えられた。

【結 論】

本研究では、BLM誘発肺線維症マウスモデルにおいて、BLM誘発前のNintedanib投与により、肺線維化を抑制した。この結果、IPF患者において、Nintedanibの早期投与についても検討する必要性が考えられた。また、Nintedanibとステロイド併用に関し、肺線維化を抑制できなかったため、IPF患者において、その投与を十分に注意、検討する必要があると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis : IPF) は、肺の高度な線維化を主体とし拘束性換気障害をきたし、ステロイドや免疫抑制剤に対する反応性が悪く、予後不良である。インドリノン誘導体のニンテダニブ (Nintedanib) は、チロシンキナーゼに対する小分子阻害薬で、抗線維化作用によりIPF患者の努力性肺活量の経年的低下に対し抑制効果が示され、2015年に保険適用となった。申請論文では、Nintedanibに加え、ステロイド併用における肺線維化の影響を検討するために、ブレオマイシン (Bleomycin : BLM) 誘発肺線維症マウスモデルを用いて、肺組織における線維化の程度、免疫組織学的な解析、気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中のコラーゲンやサイトカイン濃度を測定している。

申請者の実験結果からは、BLM誘発前におけるNintedanib投与群では、非投与群と比較し、肺線維化スコアが有意に低値であった。一方、BLM誘発後におけるNintedanib投与群では、非投与群と比較し、肺線維化は抑制されなかった。さらに、BLM誘発前におけるNintedanib投与群では、非投与群と比較し、BAL液中のコラーゲンとTGF- β 1濃度も有意に低値であった。一方、BLM誘発肺線維症マウスモデルに対するNintedanib投与は、BAL液中のVEGF、PDGF-AA、FGF2に影響を及ぼさなかった。BLM誘発前または後におけるNintedanibとDexamethasoneの併用において、BLM誘発肺線維症マウスモデルにおける肺線維化は抑制できなかった。これらの結果、申請者はIPF患者において、Nintedanibの早期投与について検討の必要性を提起している。また、Nintedanibとステロイド併用に関し、肺線維化への抑制効果が認められず、IPF患者において、その投与を十分に注意、検討す

る必要性があると結論付けている。

【研究方法の妥当性】

申請者は、同様の方法および手順にて複数回実験をリピートしている。また、十分な個体数を用いて、統計学的解析が行われている。データは、平均±標準偏差（SD）として表し、各群間の比較に対しては、Mann-Whitney U検定を使用し、P値0.05未満を有意としている。申請論文の動物実験は、獨協医科大学の動物実験委員会によって承認（第767号）されており、本研究は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

IPFは原因不明に肺の線維化を起こす難病であるが、確立した治療法はない。ヒトにおけるNintedanibの投与時期やステロイドの併用についての肺線維化に与える影響についても不明である。本研究はBLMを人工的に経気道投与することで疑似的に肺線維症マウスを作成し、Nintedanibの投与時期やステロイドの併用効果につき解析・検討している。本研究は、国内外において初めて実施し、結果を導き出しており、新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、統計解析に必要な個体数に対して、適切な解析方法を用いて検討している。これらの結果からBLM誘発肺線維症マウスモデルにおいて、Nintedanibの早期投与による有効性を明らかにしている。また、呼吸器病学や免疫学などの関連領域の知見を踏まえても、結論は論理的に矛盾するものではない。

【当該分野における位置付け】

IPFは未だに生命予後を改善させる治療法が確立していない疾患分野である。よって実臨床において、Nintedanibの疾患早期における投与の効果や、ステロイド併用が治療に及ぼす影響について一助となり得る研究報告であり、評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、呼吸器病学、免疫学、病理組織学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は、今後の肺線維症治療に影響を与える優れた内容であり、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Dokkyo Journal of Medical Sciences

(48 : 9-21, 2021)