

【14】

氏 名	内 田 信 彦 <small>うち だ のぶ ひこ</small>
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第810号
学位授与の日付	令和4年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (内科学（呼吸器・アレルギー）)
学位論文題目	Metabolic changes induced by TGF- β 1 via reduced expression of phosphatidylserine decarboxylase during myofibroblast transition (TGF- β 1刺激による筋線維芽細胞形質転換における細胞内代謝変化は、 フォスファチジルセリン デカルボキシラーゼ発現低下を介して誘導される)
論文審査委員	(主査) 教授 倉 沢 和 宏 (副査) 教授 井 川 健 教授 藤 田 朋 恵

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

間質性肺炎は肺胞領域に線維化がひき起こされ、その多くは治療に抗する不可逆的変化となる。病理組織学的、臨床的にも多彩な形態、病態を示す疾患群である。しかし、その線維化過程は様々な代謝経路があり、詳細は不明な点も多い。

【目 的】

線維芽細胞から筋線維芽細胞への形質転換時の細胞における脂質代謝変化と脂質代謝の線維化形成への関与を検討し、線維化過程に関わるそれらの脂質を同定し、新しいバイオマーカーや治療薬の開発に繋げることを目的とする。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学病院生命倫理委員会において承認されている。ヒト胎児肺線維芽細胞 (HFL-1) をトランスフォーミング・グロース・ファクター・ベータ1 (TGF- β 1) で刺激し、0時間、48時間後に細胞を回収した。セルペレットから脂質を抽出しTGF- β 1刺激 (48時間) 群と非刺激群においてQTRAP5500質量分析計 (SCIEX) にて脂質を網羅的に比較解析した。 α -SMAの蛋白発現はWestern blottingにて確認した。

【結 果】

ヒト胎児肺線維芽細胞 (HFL-1) をTGF- β 110ng/mlで刺激した結果、 α -SMA蛋白発現は刺激後48時間が最も多く、 α -SMA蛋白発現はTGF- β 1抗体によって抑制された。TGF- β 1刺激によって誘

導されたHFL-1の線維芽細胞から筋線維芽細胞への移行期において、リン脂質リピドミクス解析を行ったところ、細胞内リン脂質であるPhosphatidyl ethanolamine (PE)、Phosphatidylserine (PS)、Phosphatidylcholine (PC) のレベルが上昇し、 α -SMA蛋白質の発現量や総コラーゲン量も増加していた。この結果をもとに、これらのリン脂質の代謝に関わる酵素の発現量を調べたところ、PSをPEに異化する酵素Phosphatidylserine decarboxylase (PISD) の発現量が低下していることがわかった。さらに、TGF β -1刺激をせずにPISDをノックダウンすることにより、HFL-1の α -SMA mRNA発現量と総コラーゲン量が増加した。

【考 察】

代謝の変化は、多くの臓器の線維化の基礎となる重要なプロセスであると認識されつつあり、代謝を標的とした治療法は、線維化を軽減するための重要な戦略となる可能性がある。本研究では、TGF- β 1によって引き起こされる線維芽細胞から筋線維芽細胞への移行時の、リン脂質代謝の変化に関与する標的酵素を調べた。リン脂質の変化は、TGF-1刺激に伴い、17種類の脂質が減少し、17種類の脂質が増加した。後者には、PC、PS、PEが含まれていた。さらに、これらのリン脂質を制御する律速酵素のうち、PSからPEへの変換を司り、ミトコンドリアに局在するPISDは、TGF β -1に反応して減少した。また、PISDをノックダウンすると、TGF β -1を刺激することなく、 α -SMA mRNAの発現量が増加し、総コラーゲンの産生量も増加した。

今後の課題としては、HFL1は胎児性肺線維芽細胞であるため、PISDの発現レベルと肺線維症との関係を解明するには、肺線維症患者から分離した筋線維芽細胞と健常者の肺線維芽細胞におけるPISDの発現量とリン脂質量を比較する必要がある。次に、TGF- β 1による線維芽細胞から筋線維芽細胞への移行においてもPCの減少が観察された。PCは、ケネディ経路とも呼ばれる、コリンホスホトランスフェラーゼやコリン/エタノールアミンホスホトランスフェラーゼを介したCDP-コリン経路で合成されるため、本研究では、ケネディ経路の不活性化がPCを減少させた可能性がある。第3に、PISDノックダウンだけではSMA蛋白質の増加は誘導されない。したがって、SMA蛋白質の増加の理由を解明する必要がある。第4に、PISDノックダウン後のリン脂質の蓄積発現量や、線維芽細胞から筋線維芽細胞につながるキナーゼ経路など、ミトコンドリアのシグナル伝達関係を調べるのが今後の課題である。

ミトコンドリア代謝は、肺線維症の治療標的となる可能性がある。肺線維症の形成におけるミトコンドリア機能不全のメカニズムには、環境因子への慢性的な暴露、細胞老化、免疫学的変化、SARS-kov-2などのウイルス感染が関与していると考えられている。ミトコンドリア移植、ミトコンドリアゲノムの改変、化学物質など、ミトコンドリア機能不全に対する治療的アプローチは、これらの疾患の治療において可能性があると考えられる。

【結 論】

PISDは、HFL-1の線維芽細胞から筋線維芽細胞への移行に寄与しており、この移行にはリン脂質組成の変化を伴う。リン脂質代謝の制御とその原因酵素であるPISDは、肺線維症の新たな治療選択肢となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

【論文概要】

細胞内の代謝変化は、臓器の線維化の重要な病因の一つである。従って細胞内の代謝に関与する因子を標的とした治療法開発は、線維化を軽減するための重要な治療戦略となりうる。本研究は、Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) によって誘導される肺線維芽細胞 (Fibroblast : FB) から筋線維芽細胞 (Myofibroblast : MFB) への形質転換時におけるリン脂質代謝の変化と、リン脂質代謝に関与する酵素の発現量の変化を検討した。MFBは、コラーゲンなどを産生し臓器の線維化に関与する細胞である。

FBはTGF- β 1刺激後48hrで形態学的に紡錘形に変化し、 α -smooth muscle actin (α SMA) 発現はTGF- β 1非刺激群と比較し有意に増加し、MFBに形質転換したことが示された。TGF- β 1刺激群(MFBに変化させる群)、非刺激群 (FBのままの群) の2群において、TGF- β 1刺激48hr後に細胞から脂質を抽出し質量分析を用いてリン脂質リピドミクス解析を行った。TGF- β 1刺激群において非刺激群と比較し17種類のリン脂質の減少と17種類のリン脂質の増加が統計学的に有意に検出された。増加したリン脂質にPhosphatidylserine (PS) が含まれていたことから、PSからPhosphatidylethanolamine (PE) への合成能低下によりPSが細胞内に蓄積している可能性を推測し、PSからPEの合成に関与する複数の酵素発現量を検討した。その結果TGF- β 1刺激によりミトコンドリアに局在するホスファチジルセリン脱炭酸酵素 (Phosphatidylserinedecarboxylase : PISD) の発現量の低下が起こることを突き止めた。さらに、PISDをノックダウンすると線維芽細胞の α SMAのmRNA発現量が増加したが、蛋白量は増加しなかった。コラーゲン I のmRNA発現量と総コラーゲンの産生量は増加した。すなわちTGF- β 1非刺激下においてもPISDの発現低下のみで線維化が起こる可能性が示唆された。以上の結果から、肝線維芽細胞のミトコンドリアに局在するPISDの発現量の低下は、細胞からのコラーゲン産生を増加させることで線維化形成に関与する可能性が明らかになった。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、TGF- β 1によって誘導されるFBからMFBへの形質転換において、リン脂質リピドミクス解析を行った。その解析結果から、FBからMFBへの形質転換過程のリン脂質代謝変化への関与が想定される酵素群 (Phosphatidylserine synthase1 : PSS1)、(Phosphatidylserine synthase2 : PSS2)、PISDの発現レベルを、RT-PCR法で検討し、さらにmRNA発現低下が認められたPISDの発現をウエスタンブロット法で評価した。さらにPISDのノックダウンを行い、MFBへの形質転換への関与を検証し線維化の関与として総コラーゲン量の増加も測定している。リン脂質リピドミクス解析から標的を絞り、標的とした酵素自体の変化が線維化に与える影響を検討しており本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

間質性肺炎の線維化過程には様々な代謝経路の関与があるが、リン脂質代謝について検討した研究はわずかで、更に、ミトコンドリアの代謝酵素の関与を検討した報告はこれまでにない。TGF- β 1刺激により変化するリン脂質のバイオマーカーとしての有用性と、ミトコンドリアPISDの抗線維化治

療標的の可能性を見出した。この点において本研究は新奇性・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、PISDノックダウンが、TGF- β 1で刺激することなく、 α SMAのmRNAの発現量を増加し、総コラーゲンの産生量を増加することを併せて確認している。臨床応用への展開の前にはこれら以外にも追加実験や包括的な評価が必要であることが考察されているが、今回PISD抑制が治療標的の一つになりうるという結論は、妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

現在の実臨床では、間質性肺炎に対する抗線維化薬は2剤存在し、細胞内キナーゼ活性の抑制や慢性炎症を抑制する薬剤である。しかし、それらの抗線維化効果は不十分である。このように有効な治療法が乏しい間質性肺炎患者への治療標的候補の一つとして、細胞内リン脂質代謝を介した抗線維化薬という点に注目し、その代謝制御を行うミトコンドリアPISDを同定した。これまでの抗線維化薬とは異なる機序で線維化を制御しようとする試みであり、大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、間質性肺炎への抗線維化薬の治療変遷を理解し、この計画を立案した後に、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。得られた結果についても実地臨床で応用するための考察を加えており、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）

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition

(70 : 108-116, 2022)