

## 論文の内容の要旨

論文題目 肺線維芽細胞の遊走に対するprostanoid (PGD<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub>)の  
効果

氏名 幸山 正

線維芽細胞が近隣の組織から動員され炎症部位へ遊走していくことは生体の組織修復過程において重要であるが、過剰な遊走、集積は、組織線維化の原因となり組織機能に障害を引き起こす。prostanoidは炎症の場に潜在的に存在するメディエーターであり炎症の制御に関与していると考えられている。本研究ではこれら気道、肺胞の修復過程において重要とされる肺線維芽細胞に着目し、その遊走能を制御するprostanoidの効果役割をPGD<sub>2</sub>を中心にPGI<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub>のdataを加えて検討し、間質性肺炎、肺気腫そして気管支喘息など組織の線維化が病態進行に関与する各種呼吸器疾患の治療手段としての可能性を探ることとした。

方法 Boyden blindwell chamber techniqueに従い上下のwellを0.1% gelatinでコートした8  $\mu\text{m}$ 孔のmembraneで隔て、fibronectinやplatelet-derived growth factor (PDGF)-BBはchemoattractantとして下部wellに細胞（ヒト胎児肺線維芽細胞：HFL-1）を各種 prostanoidもしくは各種阻害剤と共に上部wellへ添加した。37°C 5% CO<sub>2</sub> 内で6時間静置し、回収したmembraneの上方表面に残っている細胞は除去した。membraneは染色し光学顕微鏡下で5 high power fields内に観察された細胞を遊走細胞としてカウントしdataとした。

## 結果

### 1) fibronectinやPDGF-BBに誘導される肺線維芽細胞へのprostanoidの効果

PGD<sub>2</sub> 10<sup>-6</sup> M、10<sup>-7</sup> Mで46.6 ± 9.0%、59.8 ± 6.4%、carbaprostacyclin 10<sup>-7</sup> M、10<sup>-6</sup> M、10<sup>-5</sup> Mで、58.0 ± 13.2%、61.2 ± 12.7%、92.6 ± 3.5%、PGE<sub>2</sub> 10<sup>-7</sup> M、10<sup>-6</sup> M、10<sup>-5</sup> Mで40.8 ± 5.3%、59.9 ± 5.2%、66.3 ± 11.2% (p < 0.05) と有意な抑制を示した。一方U-46619は濃度依存的に遊走を増加させ、2 × 10<sup>-7</sup> M、2 × 10<sup>-6</sup> Mで161.8 ± 13.4%、231.7 ± 16.5% (p < 0.05) と有意な増加効果を示した。PGF<sub>2 $\alpha$</sub> は効果を示さなかった。PDGF-BBに対するHFL-1遊走作用はPGD<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup> Mで59.2 ± 14.3% (p < 0.05)、carbaprostacyclin 10<sup>-7</sup> M、10<sup>-6</sup> Mで48.7 ± 4.6%、65.0 ± 3.4% (p < 0.05) と有意な抑制を示した。一方U-46619は濃度依存的に遊走を増加させていき、U-46619 2 × 10<sup>-7</sup> M、2 × 10<sup>-6</sup> Mで224.2 ± 21.3% (p < 0.05) と有意な増加を示した。

## 2) 肺線維芽細胞の遊走に対する各種prostanoidの効果: time course

fibronectinに対するHFL-1の遊走総数は時間とともに増加していき12時間でほぼ最大の遊走が観察された。PGD<sub>2</sub>、carbaprostacyclin、PGE<sub>2</sub>は検討したどの時間でも抑制傾向を示し、U-46619は遊走増加傾向を示した。

## 3) fibronectinによる肺線維芽細胞のchemokinesisに対するprostanoidの効果

細胞の遊走はchemoattractantの濃度勾配に沿って動くchemotaxisが主であるが、濃度勾配がなくとも動くchemokinesisも存在する。これらprostanoidのchemokinesisに対する効果を検討したところ、PGD<sub>2</sub>、carbaprostacyclin、PGE<sub>2</sub>は濃度依存的にchemokinesisも抑制しU-46619は増強した。

## 4) prostanoidが修飾する肺線維芽細胞遊走への受容体阻害剤の効果

次に阻害もしくは増強効果とprostanoid受容体との関与検討のため、HFL-1をDP受容体阻害剤AH6809 ( $2 \times 10^{-6}$  M)、TP受容体の阻害剤であるSQ29,548 ( $10^{-5}$  M)でそれぞれで1時間前処置した後、PGD<sub>2</sub>またはU46619存在有無下における遊走能を検討した。AH6809はPGD<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  M)が示すHFL-1の抑制効果を、SQ29,548はU-46619 ( $2 \times 10^{-7}$  M)が示すHFL-1の遊走増加効果を阻害した。

## 5) PGD<sub>2</sub>、carbaprostacyclin、PGE<sub>2</sub>が修飾する肺線維芽細胞遊走へのprotein kinase A阻害剤の効果

PKAの阻害剤KT5720 ( $10^{-7}$  M)で1時間前処置した細胞はPGD<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  M)、carbaprostacyclin ( $10^{-6}$  M)、PGE<sub>2</sub> ( $10^{-7}$  M)によるHFL-1の遊走抑制作用を阻害した。つまり、PGD<sub>2</sub>、carbaprostacyclin、PGE<sub>2</sub>の作用がPKAを介したものである

ことが示された。

6) U-46619が修飾する肺線維芽細胞遊走へのprotein kinase C阻害剤の効果  
PKC 阻害剤 calphostinで1時間前処置した細胞はU-46619 ( $2 \times 10^{-7}$  M)で増強したHFL-1の遊走を抑制した。

#### まとめ

今回の実験において明らかになった点は肺線維芽細胞の遊走をPGD<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> analog carbaprostacyclin、PGE<sub>2</sub>は濃度依存的に抑制し、TXA<sub>2</sub> analog U-46619 は濃度依存的に増強することである。また遊走制御のメカニズムとしてはGタンパク質共役型の受容体を介してPGD<sub>2</sub>、carbaprostacyclin、PGE<sub>2</sub>はprotein kinase Aが、Gタンパク質共役型の受容体を介してU-46619はprotein kinase Cを介した作用であることを示した。これらのことは創傷治癒過程において組織機能を維持するためにfibronectinやPDGFに反応して働く間質細胞の制御バランスがprostanoidで修飾されていることを示すものである。線維化のスイッチがどのような状況下で入るのかは不明であるが、線維化過程の一要素である遊走をprostanoidが制御できるのであれば、prostanoidの有効利用が気道もしくは肺胞の線維化抑制の治療戦略においても重要であると考えられる。