

氏 名	野口 真吾
論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)	Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice (一酸化窒素はブレオマイシン肺線維化マウスモデルにおいて保護的な役割を果たす)
論文要旨	<p><b>【目的】</b></p> <p>一酸化窒素 (nitric oxide; NO) を含むフリーラジカルは肺線維化に重要な役割を担っていることが報告されている。実際に、肺線維症患者における肺組織では、3 種の一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase; NOS: iNOS, eNOS, nNOS) の発現の亢進が認められ、さらに NO 産生の指標である血清中一酸化窒素酸化物 (NO<sub>x</sub>) の上昇も報告されており、ヒトの肺線維化の病因に関して NO は重要な役割を果たしていることが推察される。これまで、NO と肺線維化の関係として、eNOS に関しては肺の線維化に保護的な作用を有することが報告されているが、iNOS については肺線維化を増悪させるという報告が多い反面、肺線維化を抑制させるとする報告も少なからず散見される。また、nNOS に関しては肺線維化への関連性については不明である。また、これまでの NOS 阻害剤や NOS シングルノックアウトマウスを用いた報告では、NOS 阻害剤の非特異的な作用の影響や、残った NOS が相補的に作用して NO の産生を補填することから、肺線維症における NO や各 NOS isoform の本質的な役割については十分には理解されていない。このため、本研究では、3 種の NOS すべてを完全に欠失させた NO 合成酵素完全欠失 (n/i/eNOS<sup>-/-</sup>) マウスを用いて、肺線維化における NO および NOS システムの役割について検討を行った。</p> <p><b>【対象および方法】</b></p> <p>Wild-type (WT; C57/B6)、シングル NOS ノックアウト (single NOS<sup>-/-</sup>)、n/i/eNOS<sup>-/-</sup> マウスにブレオマイシン 8mg/kg 10 日間連日腹腔内投与を行い、ブレオマイシン最終投与 14 日後に肺の炎症と線維化の評価を行った。また、n/i/eNOS<sup>-/-</sup> マウスに NO 補充を行うことによる効果を併せて評価した。</p> <p><b>【結果】</b></p> <p>ブレオマイシン投与により、WT/single NOS<sup>-/-</sup> マウスと比較して、n/i/eNOS<sup>-/-</sup> マウスでは、肺の線維化スコアやコラーゲン量の増加を認めた (<math>P &lt; 0.05</math>)。また、肺線維化において重要なメディエーターである TGF-<math>\beta</math>1、CTGF の protein/mRNA level での上昇 (<math>P &lt; 0.05</math>) を認めた。さらに、WT/single NOS<sup>-/-</sup> と比較して、n/i/eNOS<sup>-/-</sup> マウスにおいて気管支洗浄液中の炎症細胞の増加 (<math>P &lt; 0.05</math>) や、炎症性サイトカインである IL-6/TNF-<math>\alpha</math> の protein/mRNA level の上昇 (<math>P &lt; 0.05</math>) を認めた。以上より、n/i/eNOS<sup>-/-</sup> マウスでは WT/single NOS<sup>-/-</sup> マウスと比較して肺線維化が増悪することが示唆された。加えて、n/i/eNOS<sup>-/-</sup> マウスに NO 補充療法を行うことにより、肺の組織学的所見や肺線維化スコア、コラーゲン量の増加が抑制された (<math>P &lt; 0.05</math>)。</p> <p><b>【考察】</b></p> <p>NO の肺線維化における本質的な役割を解明するために、すべての NOS をノックアウトさせ、NO の産生を可能な限り抑制した n/i/eNOS<sup>-/-</sup> マウスを用いて、ブレオマイシン肺線維化モデルにおける検討を行い、WT/single NOS<sup>-/-</sup> マウスと比較して、n/i/eNOS<sup>-/-</sup> マウスでは肺線維化が増悪すること、また、この増悪効果は NO の補充により抑制されることを示した。このことから、ブレオマイシン肺線維化モデルにおいて、NO は重要な保護因子であることが示唆された。NO の肺線維化に対する抑制効果の機序に関しては、肺線維化における重要なメディエーターである TGF-<math>\beta</math>1 の上昇や、その下流に位置する CTGF を介した経路に対する作用が重要である可能性が示唆された。また、NO は肺胞マクロファージにより産生される炎症性サイトカインを抑制することが報告されているが、本検討において、NO 欠失により炎症性サイトカインの増加を認めたことや、肺組織で肺胞マクロファージの増加が認められたことから、肺胞マクロファージが NO の重要な標的因子である可能性も示唆された。今回の検討では、これらの機序の十分な解明はできておらず、今後さらなる検討が必要であると考えた。</p> <p><b>【結論】</b></p> <p>内因性 NO/NOS システムは肺線維化に保護的な役割を果たす可能性が示唆された。</p>

## 学位論文審査結果要旨

氏 名	野口 真吾					
論文審査委員	主査 所属	環境・産業生態 系	環境適応医学 部門	上野 晋	(印)	
	副査 所属	障害機構 系	災害医学 部門	原田 大	(印)	
		生体情報 系	生殖生理情報 部門	楠原 浩一	(印)	
		系	部門	(印)		
		系	部門	(印)		

### 論文題目

Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice  
(一酸化窒素はブレオマイシン肺線維化マウスモデルにおいて保護的な役割を果たす)

### 学位論文審査結果要旨

一酸化窒素(NO)は呼吸の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられている。一方、肺線維症の患者において、NO合成酵素(NOS)の発現の亢進とともにNO産生の指標である血清中のNO<sub>x</sub>(一酸化窒素酸化物)量の増加も認められていることから、肺線維化にもNOは関与していることが示唆されているが、その詳細については未だ不明な点が多い。NOSには3種類(iNOS、eNOS、nNOS)のアイソフォームがあり、肺線維症とこれらNOSとの関連について、NOS阻害剤あるいはシングルNOSノックアウトマウスを用いて検討した報告があるが、NOS阻害剤の非特異的作用の影響や、残存しているNOSアイソフォームによる代償作用の影響なども示唆されている。そこで本研究では3種類のNOSアイソフォームを全て欠失させたトリプルNOSノックアウトマウス(n/i/eNOS<sup>-/-</sup>)を用いて、肺線維化におけるNOならびにNOS系の役割について検討した。

野生型(C57B/6)、3種類のシングルNOSノックアウトマウス(nNOS<sup>-/-</sup>、iNOS<sup>-/-</sup>、eNOS<sup>-/-</sup>マウス)ならびにn/i/eNOS<sup>-/-</sup>マウスに対してブレオマイシンを腹腔内投与(8 mg/kg、連続10日間)し、最終投与日から14日後に肺の炎症と線維化について肺組織染色と組織中のmRNA発現量、気管支洗浄液(BALF)の採取とBALF中の炎症細胞数およびケミカルメディエーター量の測定などから評価した。またn/i/eNOS<sup>-/-</sup>マウスについては、肺線維化に対するNOドナー(硝酸イソソルビド)の飲水投与(0.6 mg/dLの割合でブレオマイシン投与3日前から生体試料採取日まで)によるNO補充の効果についても併せて検討した。

野生型およびシングルNOSノックアウトマウスと比較して、n/i/eNOS<sup>-/-</sup>マウスでは肺線維化面積、肺組織コラーゲン量、線維化の重要なメディエーターの一つであるCTGFの有意な増加を認めた。さらにTGF-βならびに炎症性サイトカイン(IL-6やTNF-α)の肺組織内におけるmRNA発現量も有意に増加しており、BALFを用いた検討でも、n/i/eNOS<sup>-/-</sup>マウス由来のBALFにおける炎症細胞数およびTGF-β・炎症性サイトカイン量の有意な増加が認められた。またn/i/eNOS<sup>-/-</sup>マウスに対するNOドナー投与により、肺線維化面積とコラーゲン量の増加は有意に抑制された。本研究の結果からn/i/eNOS<sup>-/-</sup>マウスにおいてブレオマイシンによる肺線維化は増悪すること、またこの線維化の増悪がNOドナー投与により抑制されることが判明し、内因性NOは肺線維化に対して保護的作用を示すことが示唆された。またこのNOの保護的作用の機序として、肺胞マクロファージ由来の炎症性サイトカイン産生能、および線維化との関連が示唆されているTGF-β/CTGF経路に対する抑制作用である可能性が考えられた。

本研究はNOSシステムの完全欠損マウスを用いることによって、肺線維化における内因性NOの役割をより明らかにしたものである。このNOの保護的作用の機序については今後さらなる検討が必要ではあるが、本研究の成果は間質性肺炎を中心とした呼吸器疾患患者の生体内NOレベルが疾患の重症度・進行・予後などの予測因子の一つとなる可能性、またその治療としてNOドナーによるNO補充療法が新たな選択肢の一つとなる可能性に繋がるものであると考えられたことから、本学学位論文として適格であると判断した。

平成26年12月15日