

氏 名	鷺 野 聡
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 484 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	mTOR 阻害薬による間質性肺疾患の機序解明
論文審査委員	（委員長）教授 高 橋 将 文 （委 員）教授 岩 本 雅 弘 准教授 土 橋 洋

論文内容の要旨

1 研究目的

mTOR阻害薬は、細胞の生存・成長・増殖を調節するセリン・スレオニンキナーゼである mammalian target of rapamycin (mTOR) の活性を阻害し、細胞周期の進行及び血管新生を抑制することにより腫瘍細胞の増殖を抑制する。本邦では、2010年1月より進行性腎細胞癌の治療薬としてエベロリムスの使用が可能となり、さらに2010年9月よりテムシロリムスの使用が可能となった。また、エベロリムスは、進行性乳癌、進行性膵神経内分泌腫瘍、結節性硬化症に伴う上衣下巨細胞性星細胞腫や腎血管筋脂肪腫に対しても、有効性と安全性が確認され、本邦や欧米で適応が拡大されてきている。mTOR阻害薬は、進行性腎細胞癌を含む多くの症例に使用されるようになってきている。

しかし、これまでの国内外の臨床試験によって、mTOR阻害薬投与により、高頻度の間質性肺疾患の発現が報告されている。日本も参加した腎細胞癌を対象とした国際共同第2相臨床試験では、テムシロリムスによる間質性肺疾患が82例中14例（17.1%）に認められ、海外第3相臨床試験では、エベロリムスを投与された274例中37例（13.5%）が間質性肺疾患と診断された。

mTOR阻害薬による間質性肺疾患の病理学的所見は多彩であるが、bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) が多いとされる。また、気管支肺胞洗浄所見では、ヘルパーT細胞増多が見られることが多く、免疫の関与が示唆される。しかし、エムトール阻害薬による肺障害の機序は未だ明らかとなっていない。

mTOR阻害薬による間質性肺疾患モデルマウスを作製し、肺障害の機序を明らかにすることを研究の目的とする。

2 研究方法

本研究では、ICRマウスにテムシロリムスを反復腹腔内投与することにより、テムシロリムス肺障害モデルマウスを作製した。テムシロリムスの投与量は、低用量群で1mg/kg/日・3回/週、高用量群で10 mg/kg/日・3回/週とした。テムシロリムスもしくはvehicleの投与期間は、2、4、もしくは、8週間とした。気管支肺胞洗浄液、肺組織、血清など各種サンプルを採取し、下記事項を検討した。

①肺組織のHE染色による組織学的検討、②気管支肺胞洗浄総細胞数・各種細胞数、③気管支肺胞洗浄液上清タンパク濃度およびEvans bluedye (EBD) 肺血管透過性実験による肺血管透過性の評価、④気管支肺胞洗浄液上清・気管支肺胞洗浄液細胞における脂質成分、⑤肺組織・気管支肺胞洗浄液細胞における炎症性サイトカイン発現、⑥F4/80（マクロファージの表面抗原）を用いた肺組織免疫染色。

次に、培養細胞実験でテムシロリムスの添加実験を行い、テムシロリムスの肺胞マクロファージや肺胞上皮細胞に対する細胞障害性を検討した。

3 研究成果

- 肺の組織学的評価では、テムシロリムス投与群において、肺胞内および肺胞隔壁への炎症細胞浸潤や泡沫状マクロファージの部分的集簇、肺胞腔内へのfibrinous exudateの出現がみられた。
- テムシロリムス投与群において、気管支肺胞洗浄上清中のタンパク濃度および肺のEBD量の増加がみられた。
- テムシロリムス投与群において、気管支肺胞洗浄液上清・気管支肺胞洗浄液細胞中のコレステロール・リン脂質が増加した。
- テムシロリムス投与群において、気管支肺胞洗浄液中のリンパ球・好中球は増加し、肺組織や気管支肺胞洗浄細胞における炎症性サイトカインの発現が増加した。
- テムシロリムス投与群において、気管支肺胞洗浄液中の肺胞マクロファージは減少し、F4/80免疫染色を用いた組織学的評価でも肺組織中のマクロファージは減少した。
- 培養細胞実験においては、テムシロリムスは肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージに対して細胞傷害性を発揮し、細胞増殖を抑制した。

4 考察

本研究では、テムシロリムス投与群で肺胞腔内タンパク濃度と肺のEBD量が増加することを見出し、テムシロリムスによる肺血管透過性亢進が示唆された。また、気管支肺胞洗浄液の細胞分画や肺の組織学的変化の検討において、テムシロリムスが肺胞腔内への炎症細胞浸潤を引き起こすことを見出した。さらに、培養細胞実験においても、テムシロリムスは肺胞上皮細胞に対して細胞傷害性や細胞増殖抑制効果を有することを確認した。これらの結果より、テムシロリムスは肺胞上皮傷害を介して肺血管透過性亢進や肺への炎症細胞浸潤を引き起こしていることが示唆された。

肺サーファクタントは主に肺胞マクロファージにより除去・異化されるが、肺胞マクロファージの減少は肺サーファクタント脂質の蓄積を引き起こすとされる。本研究においても、テムシロリムス投与群で肺胞腔内に肺サーファクタント脂質（コレステロール・リン脂質）が蓄積することを見出し、また、テムシロリムスにより肺胞マクロファージが減少することをin vivoおよびin vitroで明らかにした。テムシロリムスは、肺胞マクロファージの減少を介して肺サーファクタント脂質の蓄積を促進していることが示唆された。

肺胞上皮傷害や肺への脂質蓄積は肺の炎症を惹起させることが既報により示されている。本研究においても、テムシロリムス投与群で肺および気管支肺胞洗浄細胞の両方で炎症性サイトカイ

ンの発現が亢進し、気管支肺泡洗浄液中のリンパ球も増加しており、この動物モデルにおいてテムシロリムスが肺の炎症を惹起させていることが確認された。

5 結論

本研究により、テムシロリムスは肺胞上皮傷害や肺胞マクロファージの減少を引き起こすことが明らかとなった。肺胞上皮傷害は肺血管透過性や炎症細胞浸潤を増加させ、肺胞マクロファージの減少は肺サーファクタント脂質を蓄積させる。これらが、テムシロリムスによる肺の炎症を引き起こす機序と考えられた。今後、この動物モデルの有用性をさらに検討する必要がある。

論文審査の結果の要旨

テムシロリムスやエベロリムスといった mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害薬は、進行性腎細胞がんや乳がんといったがんの治療や臓器移植後の免疫抑制、心血管インターベンション治療での薬剤溶出性ステントなどに用いられている。しかし、臨床での経験から、mTOR 阻害薬の投与では比較的高頻度に間質性肺疾患が認められることが問題となっている。現在のところ、この発症機序は不明であり、本研究では、mTOR 阻害薬による間質性肺疾患発症の分子機序の解明を目的に研究が行われた。

まず、mTOR 阻害薬による間質性肺疾患のモデル動物がないことから、申請者はテムシロリムスをマウスに週 3 回の頻度で腹腔内投与することにより、新規のマウス間質性肺疾患モデルの作製を試みた。この新規に作製されたマウスモデルでは、ヒト症例で認められる組織像と完全には一致しなかったが、肺の炎症と血管透過性亢進を呈しており、この病態を解析するのに有用なモデルであることが示された。特に、肺胞マクロファージの数が減少したにもかかわらず、泡沫化した肺胞マクロファージの割合が著明に増加していたことは、本疾患における病態を考える上で興味深い所見である。さらに、申請者は肺胞マクロファージや肺胞上皮細胞の初代培養あるいは細胞株を用いて機序を検討し、テムシロリムスがこれらの細胞に対して細胞傷害性を示すこと、低濃度においても細胞増殖を抑制することを見出した。

本研究は、二つの重要な知見を提供した。第一は、新たな mTOR 阻害薬による間質性肺疾患のマウスモデルを作製したこと、第二は、この病態モデルを用いて mTOR 阻害薬による炎症誘導機構の一部を明らかにしたことである。論文では、マウスとヒトにおける mTOR 阻害薬の濃度や作用の違い、肺胞マクロファージの泡沫化の意味、観察された現象の時系列的な順序等について、一部完全に実験により検証されていない内容も含まれていたが、これらの点に修正を加えた改訂版を確認し、本研究は学位論文に値すると審査員全員で承認した。なお、本研究の内容は、すでに American journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology 誌に受理・掲載されている。

最終試験の結果の要旨

申請者の発表はわかりやすく論理的であり、実験データの解釈やその限界についても適切に述べられた。審査委員からは、本研究の新規性、分子的な機序、実験結果の解釈、臨床への応用の可能性など、数多くの質問や意見が出されたが、いずれも適切に対応した。以上のことから、申請者の学識および研究能力は博士の学位に相応しいと、審査員全員が一致して判断した。