

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 27 年 4 月 30 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 太田記念病院
職 名 呼吸器内科 部長
研究代表者 青木 史暁

下記のとおり平成26年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:14035)

1. 共同研究課題名	肺線維症に対するコノフィリンの治療効果と病態解析		
2. 共同研究目的	肺線維症の新規治療薬として、コノフィリンの可能性を探求する。		
3. 共同研究期間	平成 26 年 4 月 1 日 ~ 平成 27 年 3 月 31 日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 青木 史暁	呼吸器内科	部長	研究の実施、解析全般
(分担研究者) 増淵 裕朗	群馬大学大学院医学研究科 臓器病態内科学	大学院生	動物実験、免疫染色など
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	細胞調節	氏 名 小島 至

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:14035)

6. 共同研究計画

肺線維芽細胞 MRC-5 を培養し、培養液に TGF- β 1 を添加すると、筋線維芽細胞への分化がみられた。培養液中へのコラーゲン産生も増加した。TGF- β 1 とコノフィリンを同時に添加すると、筋線維芽細胞への分化が抑制され、コラーゲン産生も減少した。

この系を用いて、コノフィリンが治療的に作用するのかどうかを確かめたい。そのために以下の実験を行う。MRC-5 を培養し、TGF- β 1 を添加する。24 時間後には筋線維芽細胞へ分化することが判明しているのので、この時点でコノフィリンを添加する。コノフィリンが分化した筋線維芽細胞へ作用するかどうか、免疫染色や Western blotting で確認する。培養液中のコラーゲン濃度も ELISA を用いて測定する。

TGF- β 1 の作用はおもに転写因子 Smad2/3 を介して行われる。我々の実験では、コノフィリンは Smad2/3 の活性化やリン酸化 Smad2/3 の核内移行を妨げなかった。

コノフィリンが Smad2/3 の転写を抑制するのかどうか、ルシフェラーゼアッセイにより検討する。

7. 共同研究の成果

MRC-5 へ TGF- β 1 を添加した 24 時間後に、培養液へコノフィリンを添加して 48 時間培養した。免疫染色や Western blotting によって、コノフィリンは筋線維芽細胞のマーカー α SMA の発現を有意に抑制することが判明した。免疫染色では、TGF- β 1 により誘導された α SMA がフィラメントを形成して見えていたが、コノフィリンを添付することで有意に発現が低下した。

ELISA にて培養上清のコラーゲン濃度を測定したが、TGF- β 1 により増加してきたコラーゲン濃度は、コノフィリンにより有意に低下した。

MRC-5 の培養液に TGF- β 1 を加えると 15 分後には Smad2/3 のリン酸化、核内への移行が生じる。免疫染色でこの様子がよく観察できるが、コノフィリンを TGF- β 1 と同時に添加しても、前もって添加しておいてから TGF- β 1 を添加しても、Smad2/3 のリン酸化、核内への移行には変化が見られなかった。

これらのことから、①TGF- β 1 による線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化はコノフィリンによって抑制される、②TGF- β 1 は線維芽細胞でのコラーゲン産生を促進するが、コノフィリンは TGF- β 1 によるコラーゲン産生を低下させる、③コノフィリンによる線維芽細胞分化抑制やコラーゲン産生抑制といった効果は、TGF- β 1 から Smad2/3 のリン酸化、核内移行を妨げない、ことが判明した。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)