

奨励金No.1628

熟成ニンニク抽出液を用いた特発性肺線維症急性増悪治療の試み

加藤 元康

順天堂大学大学院医学研究科呼吸器内科学 准教授

Aged Garlic Extract for Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Motoyasu Kato

Department of Respiratory Medicine, Juntendo University Graduate School of Medicine,
Associate Professor



AGE は、マクロファージの炎症性サイトカイン産生や NF- κ B 活性化を抑制し、急性肺障害モデルでも肺内炎症・肺障害を軽減した。また、IPF 患者由来肺線維芽細胞の遊走・収縮能を抑制した。さらに、ペルオキシナイトライトによる線維芽細胞活性化も抑制し、酸化・ニトロソ化ストレスへの作用が示唆された。一方、IPF 急性増悪モデルの確立には至らず、今後の検討課題である。

Aged garlic extract (AGE) suppressed inflammatory cytokine production and NF- κ B activation in macrophages and attenuated pulmonary inflammation and lung injury in a mouse model of acute lung injury. AGE also inhibited migration and collagen gel contraction in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Furthermore, AGE suppressed peroxynitrite-induced fibroblast activation, suggesting a potential effect on oxidative and nitrosative stress. However, a reproducible mouse model of acute exacerbation of IPF could not be established. Further studies are required to clarify the therapeutic potential of AGE for acute exacerbation of IPF.

1. 研究内容

1.1 研究目的

本研究は、熟成ニンニク抽出液（AGE）の特発性肺線維症（IPF）急性増悪に対する新規治療薬としての可能性を検証することを目的とした。急性増悪の病態は急性呼吸促拍症候群（ARDS）と類似していて、初期は肺への強い障害を生じ、後期層では肺の線維化をもたらす重篤な呼吸不全を呈する。そのため本研究では、初期の炎症のフェーズと後期慢性期の線維化をもたらすフェーズの病態に分け検討した。IPF 患者由来肺線維芽細胞を用いた機能活性解析および急性肺障害・肺線維化モデルマウスを用いて、AGE の抗炎症・抗線維化作用と安全性を評価するとともに、酸化ス

トレスに着目してその作用機序を解明する。これらを通じて、新たな IPF 急性増悪治療法の確立と臨床応用への基盤構築を目指す。

1.2 方法と結果

1.2.1 AGE の抗炎症効果の確認

肺障害に関与する単球・マクロファージ系細胞を用いて、AGE の抗炎症作用およびその作用機序を検証した。ヒト単球系 THP-1 細胞から誘導したマクロファージを LPS および IFN- γ で刺激し、炎症性 M1 マクロファージへの分化を誘導した。AGE 投与による炎症制御作用について、フローサイトメトリーによる M1 マクロファージマーカー CD80 の発現、RT-PCR および ELISA による IL-6、

IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1 などの炎症性サイトカインの発現・産生を評価した。また、細胞生存率を測定して AGE の細胞毒性を評価するとともに、Western blot を用いて NF- κ B のリン酸化および I κ B α の分解を解析し、抗炎症作用に関わるシグナル伝達機序を検討した。その結果、AGE は細胞生存率を損なうことなく CD80 発現を有意に低下させ、IL-6、IL-1 β 、MCP-1 を中心とする炎症性サイトカインの発現・産生を抑制した（図 1）。

さらに、AGE は NF- κ B のリン酸化および I κ B α の分解を抑制し、炎症性マクロファージへの分

化・活性化を制御することが示された（図 2）。加えて、LPS 気管内投与による急性肺障害モデルマウスを用いて AGE の効果を検証したところ、肺胞洗浄液中の好中球・マクロファージを含む炎症細胞浸潤が減少し、組織学的な肺障害も改善（図 3）した。低用量デキサメタゾンとの併用では、炎症性サイトカイン産生や肺障害に対してより強い抑制効果が認められた。以上より、AGE は NF- κ B シグナルおよび炎症性マクロファージの活性化を制御することで炎症を抑制し、急性肺障害に対する新たな治療候補となる可能性が示された。

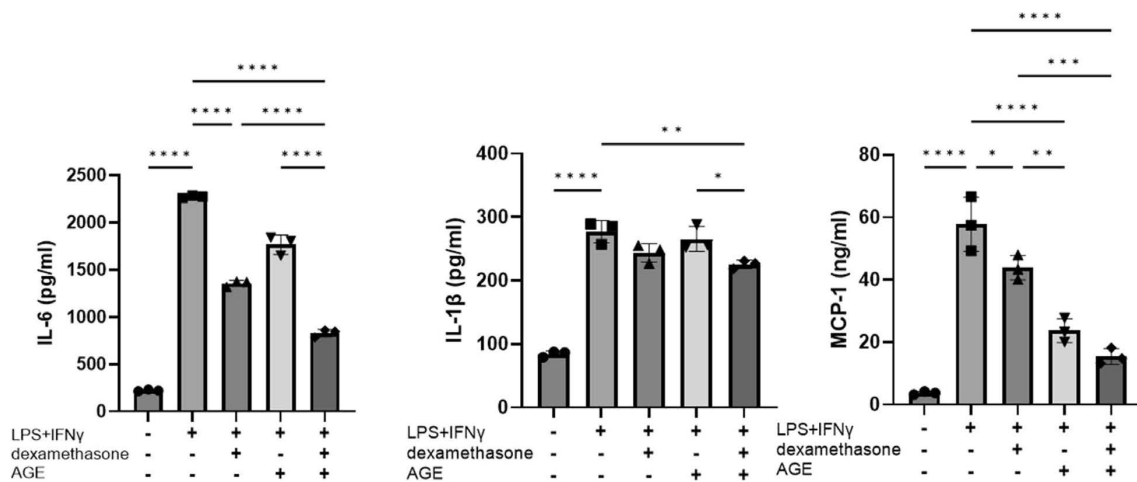


図 1. 肺胞マクロファージにおける LPS+IFN γ 刺激に対する AGE の有効性

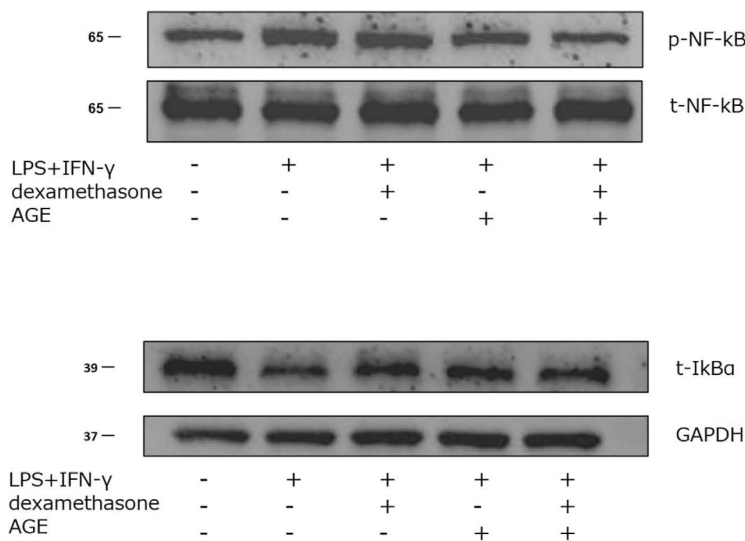


図 2. AGE の NF- κ B リン酸化と I κ B α 発現への効果

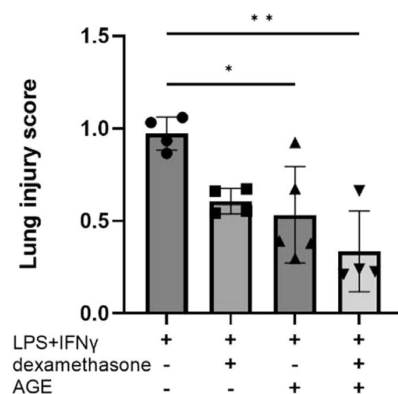


図 3. 肺障害マウスモデルへの AGE の有効性

1.2.2 IPF 由来の線維芽細胞を用いた AGE の抗線維化効果の検討

急性増悪後に進行する肺線維化は呼吸機能の低下や予後に大きく影響することから、急性肺障害に対する抗炎症作用のみならず、その後の線維化を抑制する効果の実証は重要である。これまで肺線維芽細胞株 HFL-1 を用いた検討において、AGE が TGF- β 1 刺激により亢進する線維芽細胞の遊走能およびコラーゲンゲル収縮能を抑制することを確認していた。本研究では、これらの作用が実際の IPF 病態に由来する細胞においても認められるかを検証するため、IPF 患者の線維化肺組織から分離・培養した肺線維芽細胞を用いて検討した。線維化促進因子である TGF- β 1 で細胞を刺激し、Chemotaxis assay による細胞遊走能および Collagen gel contraction assay によるゲル収縮能を評価した。その結果、IPF 患者由来肺線維芽細胞においても、AGE は TGF- β 1 刺激により亢進した細胞遊走能（図 4A）およびゲル収縮能（図 4B）を抑制した。以上より、AGE は単なる培養細胞株のみならず、IPF 患者由来肺線維芽細胞においても、線維芽細胞の遊走・収縮といった機能活性を抑制することが示された。これらの結果から、AGE が IPF における肺線維化過程を多面的に制御し、急性肺障害後に進行する線維化に対しても治療効果を有する可能性が示唆された。現在、さらに Western blot 法を用いて筋線維芽細胞分化

の指標である α -smooth muscle actin (α -SMA)、ならびに fibronectin、collagen などの細胞外マトリクス（ECM）関連蛋白の発現を解析中である。

1.2.3 抗酸化作用に着目した AGE の抗炎症・抗線維化効果

肺線維化に対する AGE の作用機序を明らかにするため、当初は HFL-1 細胞を用いた網羅的遺伝子発現・サイトカイン解析により線維化制御因子を同定し、ノックダウンや BLM 肺線維症モデルによる検証を計画した。一方、AGE は抗酸化作用を有し、IPF およびその急性増悪には酸化・ニトロソ化ストレスが関与することから、活性酸素種（RNS）の一つであるペルオキシナイトライトに着目して検討した。

HFL-1 細胞をペルオキシナイトライト (10^{-5} M) で刺激し、AGE 存在下における細胞機能を Collagen gel contraction assay および Chemotaxis assay により評価した。その結果、ペルオキシナイトライトにより亢進したゲル収縮能（図 5A）および fibronectin への遊走能（図 5B）は、AGE により有意に抑制された。さらに Western blot 法では、ペルオキシナイトライト刺激により増加した α -SMA および fibronectin の発現を AGE が有意に抑制（図 5C）した。以上より、AGE は RNS によって誘導される肺線維芽細胞

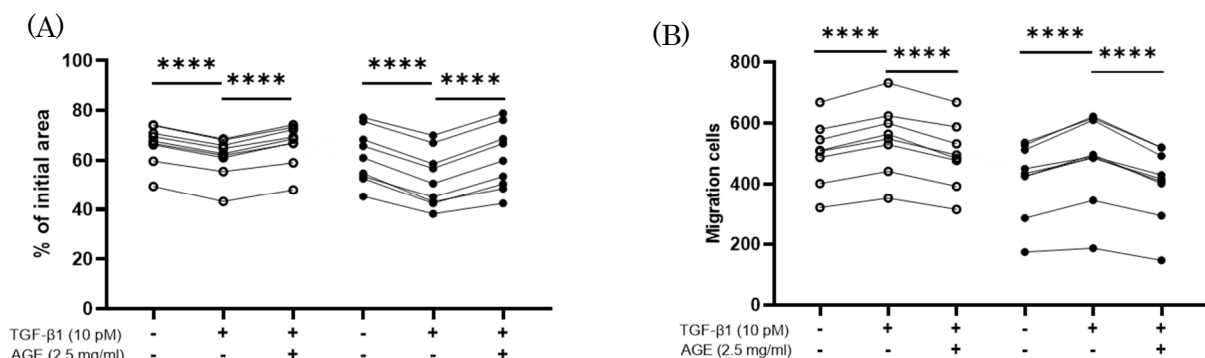


図 4. 肺線維芽細胞における (A) ゲル収縮能、(B) 遊走能の評価。左側：健常者の肺線維芽細胞、右側：IPF 患者由来の肺線維芽細胞

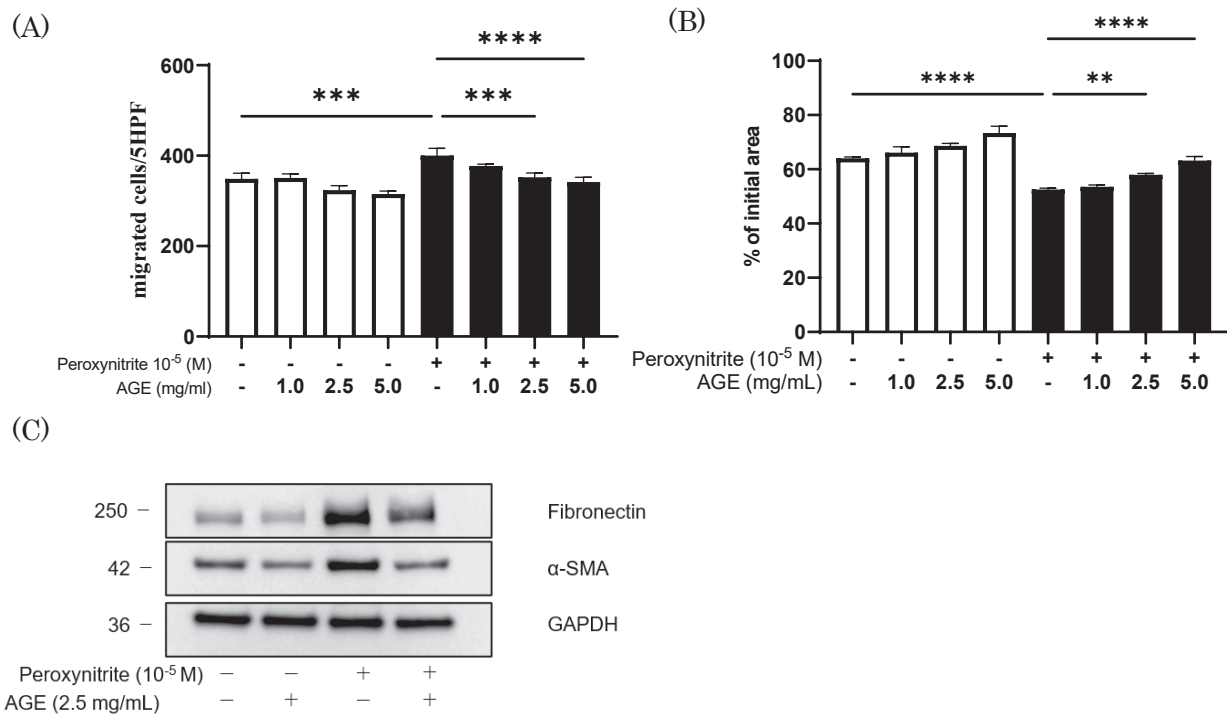


図 5. ペルオキシナイト刺激による AGE の (A) ゲル収縮能、(B) 遊走能、(C) ECM・ α SMA 発現の変化

胞の遊走・収縮などの機能活性化、筋線維芽細胞分化および細胞外マトリクス産生を抑制することが示された。一方、網羅的解析による新規制御因子の同定、ノックダウンおよび動物モデルでの機序検証には至らなかった。今後は、酸化・ニトロソ化ストレスに着目して AGE の抗線維化機序をさらに解析し、急性肺障害から線維化進展に至る病態における AGE の作用を明らかにする。

1.2.4 マウスモデルによる検討

IPF 急性増悪に対する AGE の有効性を検証するため、当初は C57BL/6J マウスにブレオマイシン (BLM) を気管内投与して肺線維症を誘導した後、リポ多糖 (LPS) または BLM を追加投与することにより、感染や薬物などを契機とした IPF 急性増悪を模したモデルを構築し、AGE の治療効果を検証することを計画した。しかし、BLM による肺線維化の程度や追加刺激後の肺障害にばらつきがみられ、急性増悪を安定して再現できる評価系の確立には至らなかった。現在さらなる安定した実

験系の構築を模索している。

1.2.5 まとめ

以上より、当初計画した IPF 急性増悪モデルの確立には至らなかったものの、AGE が IPF 急性増悪の初期病態である急性肺障害における過剰な炎症反応および肺組織障害を抑制すること、および病態後期相の線維化抑制効果について、*in vitro* および *in vivo* の両面から明らかにすることができた。今後は、今回得られた知見を基盤として、BLM による既存肺線維症に LPS 等による急性肺障害を重ねる条件を再検討し、再現性の高い IPF 急性増悪モデルを確立する。その上で、AGE が急性炎症のみならず、急性増悪後に進展する肺線維化まで抑制し得るかを検証し、IPF 急性増悪に対する治療薬としての可能性を明らかにしていく。

2. 発表（研究成果の発表）

研究成果を一部発表

Nakazawa S, Togo S, Tadokoro C, Soma S,

Arai Y, Motomura H, Nagata Y, Sueyasu T, Hirakawa H, Kurata K, Sumiyoshi I, Ochi Y, Watanabe J, Ihara H, Hoshi K, Kato M, Takahashi K. Aged garlic extract suppressed macrophage-mediated inflammation in acute respiratory distress syndrome. *Food Funct.* 2026; 17: 6095–6107. doi: 10.1039/d6fo00337k. PMID: 42300751.