

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09670

研究課題名(和文) 上皮間葉転換を標的とした薬剤性肺障害克服の試み

研究課題名(英文) The basic research of treatment for drug-induced lung injury focusing on epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

加藤 元康 (KATO, MOTOYASU)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70750313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤性肺障害は程度によっては重篤な予後不良の病態であり、その重症化のメカニズムに上皮間葉転換(EMT)が関与している可能性が示唆されている。我々はEMTに着目し、EMT抑制効果のある薬剤の肺障害抑制効果を検証した。肺胞上皮細胞へTGF- β 1により刺激してEMTを誘導した系を用いてEMTを抑制・ないし弱体化する薬剤を抽出した。特にTGF- β /SMAD系を抑制しうる薬剤について、プレオマイシンを用いたin vivo肺障害評価系の肺障害抑制効果を検証した。結果、抽出した薬剤はBLMにより誘導された肺障害を抑制することが判明した。今後は肺生検組織での評価や、有効である薬剤については臨床試験の検討も行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤性肺障害は時に重篤な薬剤投与における合併症である。特に癌患者における抗癌剤の薬剤性肺障害発症は、今後の癌治療が困難になるため、発症には厳重に注意を要する。また2000年代初頭には抗癌剤Gefitinibによる薬剤性肺障害が社会問題化した。これらの社会背景からも、薬剤性肺障害の発症を予防する、ないし発症後にも有効な治療薬、治療方法があれば、癌治療を含む多くの治療にも有効になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Drug-induced lung injury is known to be a severe disease. The mechanism of severe disease progression may associate with epithelial mesenchymal transition (EMT). First, we focused on TGF- β -induced EMT on lung epithelial cell, and we evaluated that whether several drug attenuated EMT. Then, the effect of the drug which attenuated EMT for the acute lung injury in vivo model. The drug A attenuated TGF- β -induced EMT suppressed on TGF- β /SMAD pathway. In addition, the drug inhibited bleomycin-induced lung injury in mice. We will evaluate the mechanism in detail using by human biopsy samples and plan the clinical trial using the extracted drug for the prevention of lung injury.

研究分野：間質性肺疾患

キーワード：薬剤性肺障害 間質性肺疾患 肺胞上皮細胞 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

薬剤性肺障害は抗癌剤などの特殊性の強い薬剤から、誰もが手にすることができる市販薬まで、幅広く多くの薬剤によって生じるとされている。発症には多くのメカニズムやパターンがあるとされ、時に重篤かつ致命的になり得る重大な薬剤治療における合併症である。特に悪性腫瘍患者の化学療法施行中に薬剤性肺障害を発症した場合、生命の危険や化学療法継続困難による原病の増悪を招く可能性が高く、本邦では特に多いとされる。2000年代初頭の原因性肺癌に対する上皮成長因子受容体に対するチロシンキナーゼ阻害薬である Gefitinib による薬剤性肺障害発症は、有効性や忍容性に転ではかなり期待された薬剤であった反面、市販後に内服開始後急性肺障害を生じて亡くなる症例が散見され、その後訴訟に発展するなど社会問題化となった。

薬剤性肺障害の病型は過敏性肺炎、器質化肺炎、慢性間質性肺炎、及びびまん性肺胞障害 (diffuse alveolar damage: DAD) などに分類される。中でも特に DAD を発症すると呼吸不全も強く、より重篤であり治療の反応が悪いことも多い。さらに、本疾患は原因とされる被疑薬の断定はできず、どのような薬剤でも理論上は起きうるため、肺障害を誘発するメカニズムを特定することは困難とされる。昨今、抗癌剤である Gefitinib、Bleomycin (BLM) 及び Methotrexate (MTX) に関しては機序が明らかになりつつあり、特に BLM や MTX による薬剤性障害の発症に上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition: EMT) が関与している可能性が示唆された (J Toxicol Sci. 2014;39:319-30)。特に DAD の場合、炎症期から線維化期への移行という病態も判明しており、これらの過程で EMT により誘導された間葉系細胞からの細胞外マトリクス分泌亢進の重要性が示唆されている。(BMC Pulm Med. 2014;14:67) 従って、EMT を抑制ないし弱体化する薬剤を見つけることで、薬剤性肺障害の発症を予防、あるいは重篤化を回避することが期待できるのではないかと仮説を立てた。特に進行肺癌患者における化学療法での薬剤性肺障害の発症予防に繋がれば、癌治療において多大なメリットがあると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、薬剤性肺障害におけるメカニズムのひとつに肺胞上皮障害への EMT の関与を仮説として、いくつか選定した EMT を抑制効果の可能性のある薬剤の探索、および薬理確実な検証を *In vitro* 実験で行い、*In vivo* 実験で代表的な薬剤性肺障害モデルであるブレオマイシン投与マウスで肺障害抑制効果を実証、さらには臨床試験への準備を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

In vitro EMT 評価系

ヒト肺胞上皮由来細胞株である A549 細胞を TGF- β 1 刺激により EMT を誘導し、上皮系および間葉系マーカーの発現を mRNA (定量的 PCR 法)、蛋白レベル (Western blot 法) で確認する。上皮系マーカーは E-cadherin を用い、間葉系マーカーは Fibronectin や I 型ないし IV 型コラーゲンの評価を行う。また、TGF- β 1 下流のシグナル経路の阻害効果を確認するために、SMAD2, SMAD3 など TGF- β 1-SMAD 経路などの各転写因子の発現とそのリン酸化の確認を Western blot 法にて行う。これらは TGF- β 1 とともに候補薬剤を共刺激することで、TGF- β 1 単独との因子発現やリン酸化抑制の程度の比較を行う。

現在まで数種類の EMT 抑制効果がある薬剤を選定しているが、より効果のある薬剤を探索すべく、これらの薬剤の上記検証を行い、スクリーニングを行う。

細胞の遊走能についても評価を行う。EMT により細胞間接着が減少することで遊走能が増進すると言われ、創傷治癒にも関連していると言われる。A549 細胞を播種した 48 時間後にマ

マイクロペットで傷をつけ、TGF 1 と薬剤を共刺激することにより TGF 1 のみの場合との細胞の傷への進出の違いを検証する(Wound healing assay)。

また我々は既にヒト肺胞上皮細胞株の TGF 1 誘導性 EMT に伴う遺伝子発現変化をマイクロアレイで解析し、TGF 1 刺激後の時間経過による発現の変化を確認、TGF 1 刺激後 24 時間程度での遺伝子発現が亢進しているものを評価対象とした。候補薬剤においてマイクロアレイによる遺伝子発現解析において、これらの評価対象マーカーの候補薬投与による改善効果に関して検証する。

In vivo 肺障害モデル

肺障害のマウスモデルとしては、BLM を経静脈・および経気道的に投与することにより、マウスに急性肺障害、および線維化を誘導する *In vivo* モデルが知られている。BLM 投与後の評価の時期により評価対象(肺障害または肺線維化)が異なり、BLM 投与開始後 7-14 日間程度の早期にサクリファイスし評価を行うことで肺障害の検証が可能である。BLM は元来薬剤性肺障害を生じやすい薬剤として知られており、薬剤性肺障害のモデルとしては最適である。BLM の気管内投与は day1 のみ、経静脈投与は 5 日間連続と投与日数も異なる。更に、候補薬剤を BLM 気管内または静脈内投与開始後より経口投与にて行うことで、肺障害抑制効果の有無を検証する。評価は 4 群に分けて行い、BLM + 溶媒群、BLM + 候補薬剤群、リン酸緩衝生理食塩水(PBS) + 溶媒群、PBS+候補薬剤群に分け、各群間で比較検討を行う。

サクリファイス後は肺組織の病理学的検討、気管支肺胞洗浄を行い、洗浄液の総細胞数、細胞分画、TGF 1 発現の確認を行う。肺組織の病理学的な評価は、染色に関してはヘマトキシリン・エオジン染色とマッソン・トリクロム染色で行う。線維化に関してはマッソン・トリクロム染色の方が有用であるが、今回は炎症細胞浸潤などの評価が重要であるため、よりヘマトキシリン・エオジン染色に重きを置き評価を行う。本来は線維化病変の評価で用いる Ashcroft スコアを、今回は肺障害の評価にも応用して用い、各群間の比較を行う。気管支肺胞洗浄液では、総細胞数、好中球数、リンパ球数、好酸球数、そして肺胞大食細胞数の個数を各マウスごとで行い、各群間で比較検討を行う。免疫染色による評価も併せて行う。

Human material による検証

薬剤性肺障害の発症に EMT が関与していること、薬剤性肺障害の抑制に EMT の抑制が有効であることを検証するためには、実際に薬剤性肺障害を発症した症例の肺組織の病理検体を収集し、免疫組織染色により EMT マーカーの発現を確認することが理想であるが、疾患の特性上、薬剤性肺障害発症時の組織検体の収集は気管支鏡および外科的肺生検が状態悪化の一因となってしまう可能性が高く、重症例ではほぼ不可能であるため、計症例での収集、ならびに薬剤性肺障害発症後死亡例での剖検検体の標本に関して評価を行うこととする。

4 . 研究成果

本研究では事前評価を行い、EMT 抑制効果が期待されるいくつかの候補薬剤を抽出し、まずそれぞれの薬剤における EMT 抑制効果を *In vitro* 実験により検証した。その結果、数種類の薬剤に関して着目し、*In vitro* および *In vivo* 実験を行った。

まず *In vitro* 実験であるが、A549 細胞を TGF 1(5ng/ μ g)で刺激を行い EMT を誘導すると、もともと敷石状であった A549 細胞の細胞形態が紡錘状に変形(形質転換)し、細胞間の接着が減少し遊走能が増す。刺激後 48~72 時間で細胞を回収し、定量的 PCR や Western blot 法において上皮系マーカー(E-cadherin)や間葉系マーカー(Fibronectin, Vimentin, Type I collagen, Type IV collagen)の発現を確認したところ、上皮系マーカーの発現低下、間葉系マーカーの発

現亢進を認めた。また、SMAD2, SMAD3 は TGF β によりリン酸化されることも Western blot 法により確認された。以上より EMT 評価系が本研究の実証に用いることができることを確認した。

本研究ではあらかじめ数薬剤を候補として抽出しており、それぞれの薬剤を TGF β と共に細胞に播種することで上記マーカー発現及び TGF β による発現の変化を確認したところ、複数の候補薬剤において、上皮系マーカーの発現の回復、間葉系マーカーの発現減少を認めた。またこれらの候補薬剤では SMAD2, SMAD3 リン酸化も抑制されており、EMT 阻害ないし弱体化の効果を認めた。

さらに遊走能の評価として行った Wound healing assay でも、本薬剤投与により遊走能が抑制されることを確認した。

In vivo モデルに関しては、再度評価系の確認および薬剤の有効性を確認する系の構築に時間を費やした。BLM の投与方法は、当科では元来肺線維症モデルとして ICR マウスへ BLM の経静脈投与(10mg/kg/day)を行っていたが、この手法では5日間連続投与するため、モデルの構築のみならいいが、薬剤の評価系となるとサクリファイスまでの BLM 投与の日数が少なく、BLM 投与期間中より薬剤の投与を始めないといけないため、薬剤による肺障害抑制効果と言い切れるかは判断が難しかった。そのため本評価系においては BLM 投与を気管内投与(1.5mg/kg/day)に切り替え、投与日を1日のみに変更した。また、マウスの種も、BLM を気管内投与を行う場合は、通常よく肺線維症や肺障害の評価で用いられる C57B6J マウスの方がより一般的であるため変更とした。サクリファイスの日時も再検討し、BLM 経気管内投与後 8、15 日で評価を行ったところ、よりリンパ球、好中球などの炎症細胞浸潤を認め急性肺障害のモデルとして適しているのは BLM 気管内投与後 7 日であった。以上より、C57B6J マウスへの BLM(1.5mg/kg/day) 気管内投与、8 日目にサクリファイスという系を確立した。

その後抽出薬剤による有効性の評価法の確立に着手し、BLM を投与した翌日よりサクリファイス前日までの薬剤投与により評価を行うこととした。

前述の *In vitro* 評価系で有効であった数種類の薬剤に関して本 *In vivo* 評価系でも有効性を確認する検討を行った。その結果、薬剤 A に関して肺障害を有効に抑制できることが肺組織のヘマトキシリン・エオジン染色により判明した。また、総細胞数や各細胞分画についても計測し評価を行ったところ、総細胞数、リンパ球数、好中球数で BLM 投与による上昇を、薬剤 A 投与により有意に減少することができた。血球に関してはそれぞれの血球に応じた表面マーカーなどでの免疫染色を行うことも試みたが、施行した検体ではうまく評価ができず、今後も評価方法の検討を行うが、本検討では細胞数の計測のみでの十分な結果が得られており、敢えて本実験を追加で行う意義は乏しいと考えられた。

実際のヒト肺組織を用いた検討は、想定していた通り、研究期間内では検体の収集が非常に困難であった。過去も含めた数少ない検体の中で、組織的に肺胞上皮細胞への障害を認めるケースも多いが、組織所見として間葉系細胞が増加しているかの判断は現時点の症例数では難しい。肺障害発生後に線維化を残す症例も多く、これらは線維芽細胞などの間葉系細胞から分泌される Fibronectin や Collagen などの細胞外マトリクスが増加、沈着するからと考えられる。肺障害を発症してから組織を採取する時間、および重症度も重要と思われ、本件は今後も組織採取を行った際に発症から検体採取までの期間や重症度なども検討に加え、評価を行う予定である。

現在、薬剤性肺障害への治療では経験的にステロイドや免疫抑制薬投与を行っている。しかし重症例では上記治療では救命に至らない事例も多く、新たな治療法が待たれている。更に、特にステロイドは有害事象も多く、有害事象のより少ない有効な薬剤が見つければ非常に有効である。今後の追加検討も行き、さらなる有効性や薬理的な検証を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kato Motoyasu, Takahashi Fumiyuki, Sato Tadashi, Mitsuishi Yoichiro, Tajima Ken, Ihara Hiroaki, Nurwidya Fariz, Baskoro Hario, Murakami Akiko, Kobayashi Isao, Hidayat Moulid, Shimada Naoko, Sasaki Shinichi, Mineki Reiko, Fujimura Tsutomu, Kumasaka Toshio, Niwa Shin-ichiro, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 Volume 14
2. 論文標題 Tranilast Inhibits Pulmonary Fibrosis by Suppressing TGF- β /SMAD2 Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Design, Development and Therapy	6. 最初と最後の頁 4593 ~ 4603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/DDDT.S264715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ihara Hiroaki, Mitsuishi Yoichiro, Kato Motoyasu, Takahashi Fumiyuki, Tajima Ken, Hayashi Takuo, Hidayat Moulid, Winardi Wira, Wirawan Aditya, Hayakawa Daisuke, Kanamori Koichiro, Matsumoto Naohisa, Yae Toshifumi, Sato Tadashi, Sasaki Shinichi, Takamochi Kazuya, Suehara Yoshiyuki, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 58
2. 論文標題 Nintedanib inhibits epithelial-mesenchymal transition in A549 alveolar epithelial cells through regulation of the TGF- β /Smad pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 275 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2020.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Motoyasu, Sasaki Shinichi, Nakamura Takahiro, Kurokawa Kana, Yamada Tomoko, Ochi Yusuke, Ihara Hiroaki, Takahashi Fumiyuki, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 9
2. 論文標題 Gastrointestinal adverse effects of nintedanib and the associated risk factors in patients with idiopathic pulmonary fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48593-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Motoyasu, Yamada Tomoko, Kataoka Shunichi, Arai Yuta, Miura Keita, Ochi Yusuke, Ihara Hiroaki, Koyama Ryo, Sasaki Shinichi, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 20
2. 論文標題 Prognostic differences among patients with idiopathic interstitial pneumonias with acute exacerbation of varying pathogenesis: a retrospective study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-019-1247-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Motoyasu, Sasaki Shinichi, Kurokawa Kana, Nakamura Takahiro, Yamada Tomoko, Sasano Hitoshi, Arano Naoko, Komura Moegi, Ihara Hiroaki, Nagashima Osamu, Shiota Satomi, Takahashi Fumi-yuki, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 97
2. 論文標題 Usual Interstitial Pneumonia Pattern in the Lower Lung Lobes as a Prognostic Factor in Idiopathic Pleuroparenchymal Fibroelastosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiration	6. 最初と最後の頁 319 ~ 328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000494061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Kota, Kato Motoyasu, Shukuya Takehito, Mori Keita, Sekimoto Yasuhito, Ihara Hiroaki, Kanemaru Ryota, Ko Ryo, Shibayama Rina, Tajima Ken, Koyama Ryo, Shimada Naoko, Nagashima Osamu, Takahashi Fumi-yuki, Sasaki Shinichi, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 17
2. 論文標題 Surfactant protein-D predicts prognosis of interstitial lung disease induced by anticancer agents in advanced lung cancer: a case control study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-017-3285-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Kato M, Sasaki S, Arai Y, Motomura H, Sumiyoshi I, Ochi Y, Watanabe J, Ihara H, Togo S, Takahashi K.
2. 発表標題 Long-Term Treatment with Nintedanib for Idiopathic Pulmonary Fibrosis in a Real-World Setting.
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ochi Y, Kato M, Arai Y, Motomura H, Sumiyoshi I, Watanabe J, Ihara H, Togo S, Sasaki S, Seyama K, Takahashi K.
2. 発表標題 The Clinical Features in Patients Complicated with Both Idiopathic Interstitial Pneumonias and Pneumothorax.
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Koyama K, Sakamoto S, Homma S, Sato S, Hanibuchi M, Toyoda Y, Masuda K, Imoto I, Isshiki T, Miyoshi S, Kato M, Takahashi K, Kataoka K, Kondoh Y, Nishioka Y.
2 . 発表標題 The Relationship Between Single-Nucleotide Polymorphisms Within Tollip and the Efficacy of Inhaled N-Acetylcysteine Therapy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis.
3 . 学会等名 American Thoracic Society International Conference (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Kato M, Yamada T, Nakamura T, Kurokawa K, Ochi Y, Ihara H, Takahashi F, Takahashi K.
2 . 発表標題 Differences in Prognosis for patients with Interstitial Pneumonia with Acute Exacerbation of varying etiologies.
3 . 学会等名 American Thoracic Society, International Conference (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Kono K, Kato M, Nakamura T, Yamada T, Tajima M, Ihara H, Tajima K, Shiota S, Takahashi F, Sasaki S, Seyama K, Takahashi K
2 . 発表標題 Usual interstitial pneumonia pattern in the lower lung lobes as a prognostic factor in idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis.
3 . 学会等名 American Thoracic Society, International Conference (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 R. Kanemaru, M. Kato, F. Takahashi, K. Tajima, H. Ihara, A. Wirawan, M. Hidayat, H. Bascoro, I. Takeda, D. Hayakawa, Y. Koinuma, K. Suina, T. Sato, N. Shimada, S. Sasaki, K. Takahashi
2 . 発表標題 Dasatinib Inhibits TGF β -Induced Epithelial Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells and Lung Fibrosis in Mice.
3 . 学会等名 American Thoracic Society, International Conference (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Kato, F. Takahashi, H. Ihara, K. Tajima, T. Sato, H. Bascoro, A. Wirawan, M. Hidayat, I. Takeda, D. Hayakawa, R. Kanemaru, Y. Koinuma, K. Suina, N. Shimada, S. Sasaki, K. Takahashi
2. 発表標題 Bleomycin Induced Epithelial Mesenchymal Transition in Mice.
3. 学会等名 American Thoracic Society, International Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 史行 (TAKAHASHI Fumiyuki) (70327823)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究分担者	高橋 和久 (TAKAHASHI Kazuhisa) (80245711)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------