

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K11071
 研究課題名(和文) 間質性肺炎肺に対するPDE4阻害薬のドラッグ・リポジショニングに関する基礎的検討

 研究課題名(英文) Basic study on the drug repositioning of PDE4 inhibitors for interstitial pneumonia in the lung

 研究代表者
 廣瀬 佳代(Hirose, kayo)

 東京大学・医学部附属病院・病院診療員

 研究者番号：40532221
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は特発性肺線維症患者や二次性間質性肺炎患者では正常患者と比較してPDE4の発現量が変化しておりその変化が病態形成に関与している可能性を探った。特発性肺線維症患者の肺では正常肺よりもPDE4Bの発現量が減少し、二次性間質性肺炎患者の肺では大きく発現が増強していた。つまり炎症細胞の活性化の観点からは特発性肺線維症と二次性間質性肺炎肺は異なる病態から形成される可能性が示唆された。また、PDE4Dの発現量は正常肺<特発性肺線維症<二次性間質性肺炎の順に多いことが明らかにされ、その順に気道過敏性が増強する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 治療法が非常に限られている間質性肺炎(特発性肺線維症や二次性間質性肺炎)の創薬ターゲットとして注目を受けているPDE4がその病態形成に関与する可能性を探り、疾患ごとの変化を明らかにしたことは、間質性肺炎の治療薬開発の可能性を広げたとと言える。
 現在間質性肺炎と同じ分類に属する特発性肺線維症と二次性間質性肺炎が異なる病態から成る可能性を示したことは、今後の疾患分類の枠組みに何らかの影響を与える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The applicants explored the possibility that PDE4 expression was altered in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and secondary interstitial pneumonia compared to normal patients, and that these alterations might contribute to the pathogenesis of the disease. Lungs from patients with idiopathic pulmonary fibrosis had a lower level of PDE4B expression than normal lungs, and the expression was greatly enhanced in lungs from patients with secondary interstitial pneumonia. This suggests that idiopathic pulmonary fibrosis and secondary interstitial pneumonitis lung may be formed from different pathologies in terms of inflammatory cell activation. The expression level of PDE4D was found to be higher in the order of normal lung < idiopathic pulmonary fibrosis < secondary interstitial pneumonia, suggesting that airway hypersensitivity may be enhanced in that order.

研究分野：麻酔学

キーワード：フォスフォジエステラーゼ4 間質性肺炎 ドラッグリポジショニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は慢性進行性で不可逆性の間質性肺疾患であり、その治療法は非常に限られており、そのために、肺線維症の5年生存率は多くの癌よりも低いことが知られている。古から現在に至るまで臨床使用されているステロイド療法は、しかし、肺線維症の予後を改善しないことが明らかにされている。(Mapel DW et.al. Chest 1996;110:1058-1067)

PDE は生体内のセカンドメッセンジャーである cyclic AMP (cAMP)、及び cyclic GMP (cGMP) を分解する酵素である。PDE ファミリーには、11 アイソザイム、そして少なくとも21のアイソフォームが存在しており、おおよそ アミノ酸配列、 刺激薬および阻害薬への感受性、そして cAMP もしくは cGMP、またはその両方を分解する能力によって分類されている。PDE ファミリーは、cAMP/cGMP を分解することによって、細胞内セカンドメッセンジャーを制御する

現在、呼吸器疾患に対して臨床使用されている PDE 阻害薬は二つ存在する。一つは、cGMP 特異的な PDE5 阻害薬である。もう一つは細胞内 cAMP 濃度を修飾する PDE4 阻害剤である。PDE5 選択的なシルデナフィルは原発性肺高血圧症の治療として承認されており、COPD に対しては phase

トライアルを施行中である。これまで、申請者は、原発性肺高血圧症と異なる疾患でありながら、類似する病態を持つ肺線維症において、肺高血圧の観点から PDE5 の関与を解析してきた。肺線維症が高ずると、肺高血圧を合併する症例が見受けられることに着眼したためである。

他方、PDE4 選択的阻害薬であるロフルミラストは、喘息と COPD に対する phase 臨床トライアルによって確認されている。しかしながら、肺線維症に対する PDE ファミリー阻害薬の有効性は未だ確立されていない。近年になって、PDE5 と同じ PDE ファミリーである PDE4 阻害剤に抗線維化作用があることが報告され始めた。(Dunkern TR et al. Eur J Pharmacol 2007;572:12-22.)

2. 研究の目的

PDE4 は4種存在するが、肺において発現が多く、cAMP/プロテインキナーゼA経路を通して、PDE4 は細胞増殖、分化そして細胞遊走を調節する。PDE4 の活性化は炎症応答に寄与するのである。そのため、PDE4 阻害薬は肺疾患に対して抗炎症そして抗リモデリング作用のある薬剤となりうる可能性が示唆されはじめた。

近年、PDE4B および PDE4D のノックアウトマウスが解析され、PDE4B ノックアウトマウス由来白血球では LPS に誘導される TNF- α の産生が低下しているのに対し、PDE4D ノックアウトマウスでは白血球の LPS 誘導 TNF 産生は野生型マウスと差がないことが明らかにされた。

一方、PDE4D ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較してメサコリン誘発気道収縮が減弱すること、また、PDE4D は中枢神経系において嘔吐に関わる部位に多く発現し、PDE4D ノックアウトマウスでは嘔吐の指標となる行動抑制が認められることがわかった。臨床においても PDE4 阻害薬が嘔吐を引き起こすことが知られている。

申請者らは Drug targeting point として注目を集める PDE ファミリーが間質性肺炎患者の創薬ターゲットになりうるか、発現の変化を明らかにすることで可能性を探りたいと考えた。IPF 患者や二次性間質性肺炎患者では正常患者と比較して PDE4 の発現量が変化しておりその変化が病態形成に関与していると仮説を立て、検証した。

3. 研究の方法

肺癌に対して肺切除術を受けた喫煙経験のない患者 (n=3)、特発性肺線維症合併患者 (n=5)、二次性間質性肺炎患者 (n=4) の非腫瘍肺組織を対象とした。二次性間質性肺炎患者の原疾患はそれぞれ強皮症、慢性関節リウマチ、好酸球性肺炎および血管炎であり、それらを背景として間質性肺炎を発症しているが、本研究においては一括りに二次性間質性肺炎と

して取り扱う。

肺組織からタンパク質を抽出してシンプルウエスタン法を行い、各群における PDE4B および PDE4D の発現量を明らかにした。

また、肺組織から RNA の抽出、RT-qPCR を行い、その mRNA 発現量を明らかにしようとした。

4. 研究成果

(1) タンパク質解析 (シンプルウエスタン法)

発現量の各群における違いを以下の図に示す。

(1-1) PDE4B



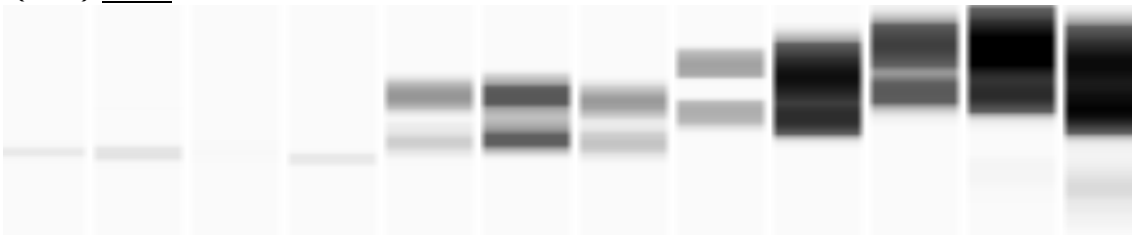
正常肺 (n=3)

特発性肺線維症 (n=5)

二次性間質性肺炎 (n=4)

特発性肺線維症患者の肺では正常肺よりも PDE4B の発現量が減少していることが明らかにされた。他方、二次性間質性肺炎肺では PDE4B 発現量が大きく増加していることが明らかとなった。PDE4B は背景で述べたように、炎症に関与する物質であると考えられている。つまり、特発性肺線維症の肺は正常肺患者よりも炎症反応が低下しており、炎症とは異なる機序で病態が形成されている可能性が示唆された。また、二次性間質性肺炎患者は PDE4B の発現が増加しており、炎症を背景として病態が形成された可能性が考えられた。つまり炎症細胞の活性化の観点からは特発性肺線維症と二次性間質性肺炎肺は異なる病態から形成される疾患であるかもしれないことが明らかになった。

(1-2) PDE4D



正常肺 (n=3)

特発性肺線維症 (n=5)

二次性間質性肺炎 (n=4)

PDE4D の発現量は正常肺 < 特発性肺線維症 < 二次性間質性肺炎の順に多いことが明らかにされた。背景に述べたように、PDE4D は、気道過敏性に関与する物質であると考えられている。つまり、特発性肺線維症患者では正常肺患者よりも気道過敏性が増強する可能性がある。さらに二次性間質性肺炎患者では PDE4D 発現量が高く、必ずしも臨床所見と相関するとは考えられないが、本研究結果を以て考察するのであれば、3 群の中でもっとも気道過敏性が高い可能性がある。

今回の研究では中枢神経系における発現量の変化は観察していないが、PDE4D は中枢神経系において嘔吐に関与するという報告が多数あるため、今後検証する価値があると考えられる。

(2) mRNA 解析

肺検体より total RNA を抽出した。cDNA を合成し、qPCR により human BETA-ACTIN 遺伝子の発現量により total RNA の品質を確認したところ、どの検体でも発現量が低いという結果になった。Total RNA の品質が疑われたため、一部検体を用いて変性アガロースゲル電気泳動で品質を確認した。電気泳動の結果、ヒト肺検体では 2 本の ribosomal RNA のバンドが明確に確認できず、また低分子にスメアなバンドが確認されたため、total RNA の分解が生じていることが明らかとなった。

そのため、qPCR を行うための total RNA 品質がないと判断し、PDE の qPCR 解析を断念した。

同検体は手術標本であるため、病理診断用が優先され、病理医に検体確保を依頼したため、その間に標本の RNA が分解された可能性がある。臨床標本を用いる研究であるため、患者の手術・診断が優先されるのが最も重要なので、この研究に関してはこれ以上の工夫を行う余地はなかったと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirose K, Ogura M, Yamada Y	4. 巻 66
2. 論文標題 Anesthesia for a long-term anorexic patient with end-stage liver cirrhosis: A Case Report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Med Invest	6. 最初と最後の頁 337-339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 須井翼, 藤枝俊宣, 廣瀬佳代, 梅津信二郎
2. 発表標題 非拘束的な心電計測用電極の開発
3. 学会等名 日本材料科学会主催 2019年度学術講演大会, 第3回インフォーマティク・バイオマテリアル研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Cheng Zhou, Kayo Hirose, Shinjiro Umezu
2. 発表標題 Discussion of using OpenPose to analysis the walking parameter
3. 学会等名 International Symposium on BioComplexity (ISBC) 2019 Summer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsubasa Sui, Toshinori Fujie, Kayo Hirose, Shinjiro Umezu
2. 発表標題 Development of Electrodes for Long-term High Precision ECG Measurement that is Non-invasive to Everyday Life
3. 学会等名 International Symposium on BioComplexity (ISBC) 2019 Summer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kayo Hirose
2. 発表標題 Decrease of serum cortisol is related to postoperative euphoria in anesthetized patients
3. 学会等名 International Symposium on BioComplexity (ISBC) 2019 Summer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須井翼, 藤枝俊宣, 廣瀬佳代, 梅津信二郎
2. 発表標題 非侵襲的心電モニタリングに適した電極の基礎特製の検討
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス講演会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬佳代, 須井翼, 藤枝俊宣, 梅津信二郎, 山田芳嗣
2. 発表標題 医療機関受診前での心室細動患者拾い上げデバイスの開発
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬佳代, 川島征一郎, 内田寛治, 小倉信, 山田芳嗣
2. 発表標題 肺線維症、二次性間質性肺炎肺におけるホスホジエステラーゼ発現量
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須井翼, 藤枝俊宣, 廣瀬佳代, 梅津信二郎
2. 発表標題 バイタルモニタリング用電極における基礎特性の検討
3. 学会等名 日本材料科学会 第2回インフォマティク・バイオマテリアル研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須井翼, 藤枝俊宣, 廣瀬佳代, 梅津信二郎
2. 発表標題 機械学習を用いた、ナノシート電極心電計における接触不良の判定
3. 学会等名 2018年度日本材料学会関東支部主催学生研究交流会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sui T, Fujie T, Hirose K, Umezue S
2. 発表標題 Evaluation of electrode material for vital monitoring that is non-invasive to everyday life
3. 学会等名 International Symposium on Artificial Life and Robotics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須井翼、藤枝俊宣、廣瀬佳代、梅津信二郎
2. 発表標題 ナノシートを用いたバイタルモニタリングデバイスの開発
3. 学会等名 第25回材料科学若手研究者討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣瀬佳代、川島征一郎、内田寛治、小倉信、山田芳嗣
2. 発表標題 肺線維症病態形成におけるフォスフォジエステラーゼ
3. 学会等名 日本麻酔科学会第64回学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 心電モニタリングシステム	発明者 梅津信二郎、廣瀬佳代、藤枝俊宣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-101096	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	山田 芳嗣 (Yamada Yoshitsugu) (30166748)	東京大学・医学部附属病院・名誉教授 (12601)	