

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06691

研究課題名（和文）線維芽細胞の働きを選択的に抑制する分子機構の解明と肺線維症治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of preferential suppression of fibroblast activity and its application to the treatment of pulmonary fibrosis

研究代表者

田中 健一郎（Tanaka, Ken-ichiro）

武蔵野大学・薬学部・講師

研究者番号：30555777

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：難病である特発性肺線維症（IPF）の発症・増悪には、活性酸素などによる肺胞上皮細胞傷害をきっかけとした肺線維芽細胞の異常増殖や活性化（コラーゲン過剰産生など）が大きく関与する。本研究では、肺胞上皮細胞に傷害性を示さず、線維芽細胞選択的に細胞死を誘導する化合物（既承認医薬品）をIPF治療薬として応用することを目指して研究を実施した。その結果、候補化合物が肺線維症のマウスモデルに対して有効性を発揮することを見出した。また、その効果が既存治療薬であるピルフェニドンなどよりも優れていることや候補化合物が消化管や肝臓における副作用を誘発しないことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピルフェニドンやニンテダニブなどの治療薬は存在するが、有効性を示さない患者が存在することや副作用を誘発することなどから、IPFに対する新規治療薬の開発が望まれている。本研究で用いた候補化合物は、肺線維症に対して既存治療薬より優れた有効性を発揮し、副作用を起こしにくいことを動物モデルを用いて明らかにした。このように本研究では、難病であるIPFに対して安全で有効な候補化合物を発見しており、臨床的な意義が大きいと考えている。また、本研究では、候補化合物が線維芽細胞選択的に作用するターゲット候補を発見しているので、今後のIPF治療薬開発における一助となるのではないかと考えている。

研究成果の概要（英文）：The onset and exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), an intractable disease, involves abnormal proliferation and activation of lung fibroblasts (e.g., collagen overproduction) triggered by alveolar epithelial cell injury caused by reactive oxygen species (ROS). In this study, we aimed to apply compounds (approved drug) that preferentially induce cell death in fibroblasts without damaging alveolar epithelial cells as a therapeutic agent for IPF. As a result, we found that the candidate compound showed efficacy against a mouse model of pulmonary fibrosis. We also found that the efficacy was superior to that of existing drugs such as pirfenidone, and that the candidate compound did not induce side effects in the gastrointestinal tract or liver.

研究分野：薬理学

キーワード：肺線維症 線維芽細胞 線維化 既存薬 IPF 呼吸器

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は、肺が線維化して呼吸困難を来す難病であり、診断後の平均生存年数が約3年と非常に短い。IPF治療にはステロイドや免疫抑制剤が用いられてきたが、顕著な治療効果が見られない。一方、ビルフェニドンやニンテダニブという新薬が開発されたが、重篤な副作用を誘発する事や有効性を示さないケースが報告されている (King TE et al, *N Engl J Med.*2014; Richeldi L et al, *N Engl J Med.*2014)。したがって、IPFを治療するための新たなターゲット分子を発見し、より効果が高く、副作用の少ない治療薬を開発する事が重要である。

IPFの発症・増悪には、活性酸素などによる肺胞上皮細胞傷害をきっかけとした肺線維芽細胞の異常増殖や活性化 (筋線維芽細胞への分化、コラーゲンの過剰産生など) が関与する (Chambers RC et al, *Ann Am Thorac Soc.*2015)。また、IPF患者では健常人に比べて、肺胞上皮細胞の細胞死が過剰に誘導されている一方で、肺線維芽細胞の細胞死がほとんど起きていない事が報告されている (Maher TM et al, *Am J Respir Crit Care Med.*2010)。そこで、研究代表者は、肺胞上皮細胞に傷害性を示さず、肺線維芽細胞選択的に細胞死を誘導し、その働きを抑制する化合物がIPF治療薬として有望ではないかと考えた。また、そのような化合物を発見し、そのターゲット分子を同定できれば、IPFを治療するための新たなターゲット分子の発見に繋がるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

これまでに申請者は、独自の既承認薬ライブラリーを用いて、新たな薬効を持つ薬の探索を行い、その薬を別の疾患の治療薬として応用する創薬戦略 (ドラッグリポジショニング) を実施している (Tanaka K et al, *Nat Commun.*2013; Tanaka K et al, *Sci Rep.*2014; Tanaka K et al, *Sci Rep.*2017)、本研究でも同様の戦略を用いる。本研究期間開始時点までに、肺胞上皮細胞を傷害せず、線維芽細胞選択的に細胞死を誘導する候補化合物を発見している。そこで本研究では、候補化合物が線維芽細胞選択的に細胞死を誘導する分子機構 (ターゲット分子) を明らかにすること、及び候補化合物のIPFに対する有効性を明らかにすることを目的に実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) IPF動物モデルを用いて候補化合物の有効性を検証

ブレオマイシン (BLM) 肺線維化モデル (IPF動物モデル) に対する候補化合物の治療効果を解析した。また、既存薬 (ビルフェニドン・ニンテダニブ) と治療効果を比較した。具体的には、BLM投与10日後から候補薬、及び既存薬の投与を開始し、BLM投与21日後に以下の指標を元に有効性を解析した (評価項目: 呼吸機能 (努力肺活量、肺の硬さ)、ハイドロキシプロリン、組織染色画像)。

### (2) IPF動物モデルを用いて候補化合物の副作用を検証

BLM肺線維化モデル (IPF動物モデル) に候補化合物を投与した時の副作用を解析した。既存薬 (ビルフェニドン・ニンテダニブ) では、胃腸傷害や肝障害マーカーが上昇することが報告されているので、それらの副作用に着目して解析した。

### (3) IPF 患者由来線維芽細胞での線維化因子解析

LL29 細胞 (IPF 患者由来線維芽細胞) を用いて TGF- $\beta$  刺激依存の線維化因子 (  $\alpha$ -SMA、及び Collagen ) 発現増加に対する候補薬の効果を解析した。

### (4) 候補薬の同種同効薬を用いた線維芽細胞選択的な細胞死の検討

LL29 細胞、及び A549 細胞 (肺胞上皮細胞) を用いて、候補薬、既存薬、同種同効薬を 24 時間処理した後の細胞生存率を、CellTiter-Glo<sup>®</sup>試薬を用いて測定した。

## 4 . 研究成果

### (1) IPF 動物モデルを用いて候補化合物の有効性を検証

BLM を投与することにより肺線維化が促進した。一方、候補薬を投与することにより肺線維化が顕著に抑制された。また、コラーゲン特異的アミノ酸であるハイドロキシプロリン量を測定した結果、候補薬は BLM によるハイドロキシプロリン量上昇を有意に抑制した。次に、研究代表者はマウス用ベンチレーターを用いてマウスの肺機能を調べた。BLM 投与により Total elastance、Tissue elastance 上昇が見られたが、候補薬はこの上昇を有意に抑制した。さらに代表的な臨床指標である努力肺活量 (FVC) に着目して解析した結果、候補薬が BLM 依存の FVC 低下を有意に改善することを見出した。一方、この実験条件において、既存薬であるピルフェニドン、及びニンテダニブは BLM 依存の線維化、ハイドロキシプロリン量上昇、呼吸機能悪化に対して、有効性をほとんど示さなかった。以上の結果から、候補薬は既存薬であるピルフェニドン、及びニンテダニブよりも IPF に対して優れた有効性を発揮することが示唆された。

### (2) IPF 動物モデルを用いて候補化合物の副作用を検証

既存薬では、胃腸傷害、肝機能障害などの副作用が誘発されることが報告されているので、これらの副作用に着目して、候補薬がこれらの副作用を誘発するかを解析した。候補薬は IPF 動物モデルに有効性を示した用量の 5 倍量を経口投与した。まず、肉眼での観察結果から、候補薬投与群において、下痢、血便などの便通異常は確認されなかった。また、胃、及び大腸の切片を作成し、組織学的解析を実施したが、候補薬による胃粘膜傷害、及び腸管傷害は全く観察されなかった。次に、候補薬を投与して 24 時間後の血液を回収し、種々の血液マーカーを確認した。具体的には、血液中の Total protein、Albumin、A/G 比、Total bilirubin、AST、ALT、ALP、Amylase、BUN、Creatinine、Total cholesterol、血糖値を測定したが、候補薬投与によるこれらの血液マーカー異常は確認されなかった。以上の結果から、候補薬は線維化病態に投与した場合も安全性が高いことが示唆された。

### (3) IPF 患者由来線維芽細胞での線維化因子解析

LL29 細胞 (IPF 患者由来線維芽細胞) に TGF- $\beta$  を処理した時の  $\alpha$ -SMA、及び Collagen-1 の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。いずれの因子も TGF- $\beta$  処理によって発現が有意に増加したが、候補薬を同時処理することによりこれら線維化促進因子の発現上昇が有意に抑制された。この結果から、候補薬が線維芽細胞選択的に細胞死を誘導するだけでなく、線維芽細胞の活性化を抑制することが示唆された。

### (4) 候補薬の同種同効薬を用いた線維芽細胞選択的な細胞死の検討

候補薬の同種同効薬を用いて、線維芽細胞選択的な細胞死が見られるかを解析した。6 種類の

同種同効薬を用いて解析した結果、6種類中3種類の同種同効薬において、肺胞上皮細胞に毒性を示さず、線維芽細胞選択的に細胞死を誘導するという結果が得られた。一方、他の3種類では線維芽細胞選択的な細胞死誘導は確認されなかった。そこで、候補薬と同様の効果が見られた3種類の薬剤の化学構造を解析した結果、共通の骨格を有することが判明した。以上の結果から、候補薬が元々の作用を発揮する分子とは異なるターゲット分子を介して、線維芽細胞選択的に作用することが示唆された。また、線維芽細胞選択性を有するには共通の骨格が必要である可能性が示唆された。尚、詳細な分子機構については、マイクロアレイ解析、及びパスウェイ解析などの手法を用いて、網羅的な解析を実施している。さらに、候補薬と同様の効果を示した同種同効薬（薬剤A）を用いて、IPF動物モデルでの有効性を解析した結果、薬剤AにおいてもBLM依存の線維化、ヒドロキシプロリン量上昇、呼吸機能悪化に対する抑制効果が確認された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Tanaka Ken-ichiro, Shimoda Mikako, Takafuji Ayaka, Hino Yuuki, Sugizaki Toshifumi, Kawahara Masahiro                          | 4. 巻<br>92            |
| 2. 論文標題<br>Idebenone has preventative and therapeutic effects on pulmonary fibrosis via preferential suppression of fibroblast activity | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Proceedings for Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society  | 6. 最初と最後の頁<br>3~P-084 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1254/jpssuppl.92.0_3-P-084  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Sugizaki T, Tanaka KI, Asano T, Kobayashi D, Hino Y, Takafuji A, Shimoda M, Mogushi K, Kawahara M, Mizushima T.                | 4. 巻<br>5          |
| 2. 論文標題<br>Idebenone has preventative and therapeutic effects on pulmonary fibrosis via preferential suppression of fibroblast activity. | 5. 発行年<br>2019年    |
| 3. 雑誌名<br>Cell Death Discov.   | 6. 最初と最後の頁<br>146- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41420-019-0226-y.  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Tanaka KI, Kubota M, Shimoda M, Hayase T, Miyaguchi M, Kobayashi N, Ikeda M, Ishima Y, Kawahara M.   | 4. 巻<br>268(Pt A)     |
| 2. 論文標題<br>Thioredoxin-albumin fusion protein prevents urban aerosol-induced lung injury via suppressing oxidative stress-related neutrophil extracellular trap formation. | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Environ Pollut.  | 6. 最初と最後の頁<br>115787- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.envpol.2020.115787.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中 健一郎、下田 実可子、高藤 綾香、日野 優生、杉崎 俊文、川原 正博 |
| 2. 発表標題<br>線維芽細胞選択的に作用する薬の探索と特発性肺線維症治療薬への応用      |
| 3. 学会等名<br>第92回日本薬理学会年会                          |
| 4. 発表年<br>2019年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ken-ichiro Tanaka, Mikako Shimoda, Ayaka Takafuji, Yuki hino, Toshifumi Sugizaki, and Masahiro Kawahara   |
| 2. 発表標題<br>Therapeutic effect of idebenone on pulmonary fibrosis via preferential suppression of fibroblast activity |
| 3. 学会等名<br>CHEST Congress 2019 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|