

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：21601
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2014
課題番号：23591159
研究課題名(和文) PAR-2 制御による IPF 急性増悪新規治療法の探究

研究課題名(英文) Efficacy of PAR-2 antagonists in lung fibrosis

研究代表者
鈴木 朋子 (SUZUKI, TOMOKO)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・准教授

研究者番号：10400342
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は、特発性肺線維症(IPF)の急性増悪のメカニズムを解明し、肺保護作用があると考えられるPAR-2レセプターをターゲットとしたIPF急性増悪の新規治療法を探索する事であった。これまでの実験で、II型肺胞上皮細胞におけるPAR-2の活性化がTGF-betaの発現を増加させ、線維化の過程と考えられているEMTを促進させる現象を確認した。さらに、PAR-2の阻害ペプチド(アンタゴニスト)が、これらの減少を抑制することを確認し、肺の線維化にPAR-2が関与し、将来的に治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pathogenetic mechanisms of idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) remain unclear. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) may play a key in the pathogenesis of fibrosis. Transforming growth factor (TGF)-beta is known to induce the transformation of fibroblasts to myofibroblasts and EMT of epithelium. Protease activated receptor (PAR)-2 has been recognized as a key molecule regulating inflammation and fibrosis. We hypothesized that PAR-2 activation induces TGF-beta and EMT. Functional PAR-2 was expressed on lung epithelium. PAR-2 activation by trypsin or PAR-2AP induced TGF-beta. PAR-2 activation led to cleavage of E-cadherin and induction of vimentin expression. These phenomena were blocked by PAR-2 inhibiting peptide. PAR-2 activation induces TGF-beta and EMT of lung epithelium, processes that may contribute to lung fibrosis. PAR-2 may be a key molecule driving lung fibrosis and thus represent a novel therapeutic target.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺線維症急性増悪

1. 研究開始当初の背景

IPFの急性増悪は、新たな浸潤影とともに急速な呼吸不全の進行がみられる重篤な病態である。「IPFの急性増悪」はわが国で初めて提唱された概念で、欧米ではその認識が乏しく長い間疾患概念が正しく認識されなかった。しかしながら、IPFには死亡率が60~100%に及ぶ「急性増悪状態」が存在する事実は、細かな差はあれ、全世界の共通認識になりつつある(Papanikolaou IC et al. *Curr Opin Pulm Med*.2010;16:480-486)。

IPFの急性増悪は、病理学的には usual interstitial pneumonia:UIPにDADが合わさったものとはほぼ同義である。なぜIPFに高率にDADが合併してくるのかは今のところ不明であるが、この「すでに起こってしまったDAD」については、治療の対象としてこれまでも多くの研究が進められてきた。ステロイド・免疫抑制剤の大量投与に加え、好中球エラスターゼ阻害薬やポリミキシンカラム(PMX)を用いる試みがそれである。しかし、これらには無効例も多くさらなる新しいアプローチが必要である。

そこでわれわれが着目したのがPAR-2である。ではなぜPAR-2なのか？われわれは、急性肺傷害モデル実験にて、好中球エラスターゼがPAR-1を介して上皮細胞のアポトーシスを促進することを発表している(Suzuki T et al. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:231-247)。その予備実験において、ケモカインを吸入させた肺傷害の動物モデルではPAR-1の活性が肺傷害を促進したのに対し、PAR-2の活性はむしろこの肺傷害に対し保護的に働いたという結果が得られていた。

PARはG-タンパク質共役型受容体(G Protein-coupled receptor)の一つで、PAR-1からPAR-4までがクローニングされている。このうちPAR-1はトロンビンなどのレセプターとして、またPAR-2はトリプシンやトリプターゼ、凝固因子Xa(Factor Xa:FXa)などのレセプターとして知られている。PARは次ページの図(Laurent GJ et al. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33: 213-215より引用)に示すように、N末端の特異部分がこれらのプロテアーゼで切断されることで活性化し、残された末端(Tethered Ligand)がレセプターの一部に結合することで細胞内にシグナルが伝達される。このメカニズムゆえ前述のようなタンパク分解酵素だけでなく、Tethered Ligand自体も活性化ペプチド(PARs activating peptide)としてPARのアゴニストになりうる。PARsは血小板、血管内皮細胞や上皮細胞にも発現しており、凝固系のみならず炎症全般に広く関与する。

IPFの急性増悪の病理では、DADのほかに気腔内器質化病変も多数出現する。気道上皮細胞ではFXaによるPAR-2を介した上皮細胞の修復促進、PAR-2 agonistによるfibrin形成増強が知られている(Ewen D et al. *Clin Exp Allergy* 2010;40:435-449)。これらはPAR-2

の活性が、創傷治癒の方向に働いていることを示唆しており、前述のわれわれの予備実験を支持する内容といえる。一方でFXaはPAR-2を介し線維芽細胞の増生、筋線維芽細胞への分化を促す(Borensztajn K et al. *Am J Pathol* 2008;172:309-320)。これらは「IPFの急性増悪」時に起こる肺胞腔へのフィブリン沈着と線維芽細胞の増生にPAR-2が関与することを示唆している。ゆえにPAR-2の具体的な役割を解明することによりPAR-2レセプターのコントロールによる「IPFの急性増悪」治療の可能性を探究できると考えるものである。

2. 研究の目的

特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis:IPF)の急性増悪は、その病態の複雑性ゆえ治療は困難を極め、依然非常に高い死亡率を有することから、有効な新規治療の開発が急務とされる。本研究では、IPFの急性増悪時に起こるDAD(diffuse alveolar damage)に着目しそのメカニズムを追求するとともに、肺保護作用があると考えられるprotease activated receptor(PAR)-2に着目した。PAR-2はDADにみられるフィブリン沈着と線維芽細胞の増生を同時にコントロールしうるレセプターでもあり、本研究で、PAR-2をターゲットにしたIPF急性増悪の新しい治療法の可能性を探る。

まずIPFの急性増悪におけるPAR-2の役割を明解にし、PAR-2の制御によるIPF急性増悪治療の可能性を*in vitro*、*in vivo*実験を通して探ることを目的とした。

3. 研究の方法

「IPFの急性増悪」の病理像で特徴的な所見は肺胞腔内へのフィブリン沈着と線維芽細胞の著明な増生である。本研究では、フィブリン形成と線維芽細胞の増生にPAR-2の活性が関与しているのか、そのメカニズムとともに明らかにし、PAR-2を制御することで「IPFの急性増悪」がコントロールできるのかを検討する。

(1) *in vitro*: PAR-2の活性がフィブリン合成や線維化を促進するか？

ヒト肺線維芽細胞および肺上皮細胞において、PAR-2ヒト肺上皮細胞を用い、PAR-2の機能的発現を確認しPAR-2アゴニストがフィブリン形成を促進するかを検討する。

ヒト肺線維芽細胞と肺上皮細胞を用い、ともにPAR-2の機能的発現を確認し、PAR-2の活性化で、前者においては線維化の指標であるalpha-smooth muscle actin:α-SMAやtransforming growth factor-beta1:TGF-β1の合成を、後者においてはepithelial-to-mesenchymal transition:EMT等について、シグナル伝達も含めて検討する。

(2) *in vivo*: PAR-2を阻害することでプレオマイシンによる肺傷害を抑制できるか？

PAR-2ノックアウトマウスを用いてプレオマイシン投与モデルを作成し、PAR-2の役割

を検討する。(i)mortalityの検討、(ii)肺機能検査、(iii)血清およびBAL液中の各種バイオマーカーの解析、(iv)肺でのPAR-2発現亢進の有無、(v)肺組織のフィブリン量の解析、(vi)肺の病理学的解析を検討する。IPF急悪患者の血清、BAL液、肺組織でも同様の解析を行う。

in vitro、*in vivo*両者において、PAR-2アンタゴニストを用い、フィブリン沈着や線維芽細胞の増生などを抑制するかを検討し、これらが新規治療薬となり得るかを探る。

4. 研究成果

研究者の所属異動などがあり、大幅に研究が遅れ、当初*in vitro*~*in vivo*までの予定であったが、延長1年を加え*in vitro*までにとどまることとなった。

(1)肺線維芽細胞としてMRC5、WI38、肺上皮細胞としてCalu-3、A549を用い、まずはPAR-2の発現を検討した。結果はRNAレベルでも蛋白レベルでもPAR-2の発現は認められた。またこれが機能的発現であることは細胞内カルシウム濃度の測定により確認した。

(2)肺線維芽細胞においてはsmooth muscle actinの発現がPAR-2アゴニストであるPAR-2 activating peptideやtrypsinで亢進することを確認した。そのメカニズムとしてMAPキナーゼに着目し、同じくPAR-2アゴニストでERKのリン酸化が起こることも確認した。

(3)肺線維芽細胞およびII型肺胞上皮細胞においてPAR-2アゴニストがTGF- β の合成促進および、II型肺胞上皮細胞においてEMTを促進することを確認した。

(4)上記(1) (2) (3)はPAR-2アンタゴニストであるPAR-2 inhibiting peptideによりすべて抑制されることも確認された。今後これらをまとめて論文作成を行う予定である。

なお、*in vivo*実験については、H26年度からの基盤C研究において継続して行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Zemans RL, Briones N, Campbell M, McClendon J, Young SK, Suzuki T, Yang IV, DeLanghe S, Reynolds SD, Mason RJ, Kahn M, Henson PM, Colgan SP, Downey GP. Neutrophil transmigration triggers repair of the lung epithelium via β -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108: 15990-15995, 2011

2. Yamashita CM, Dolgonos L, Zemans RL, Young SK, Robertson J, Briones N, Suzuki T, Campbell MN, Gauldie J, Radisky DC,

Riches DW, Yu G, Kaminski N, McCulloch CA, Downey GP.

Matrix metalloproteinase 3 is a mediator of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 179: 1733-1745, 2011

3. Hagiwara K, Morino H, Shiihara J, Tanaka T, Miyazawa H, Suzuki T, Kohda M, Okazaki Y, Seyama K, Kawakami H.

Homozygosity mapping on homozygosity haplotype analysis to detect recessive disease-causing genes from a small number of unrelated, outbred patients. *PLoS One*. 6: e25059, 2011

4. Fujino N, Kubo H, Suzuki T, He M, Suzuki T, Yamada M, Takahashi T, Ota C, Yamaya M. Administration of a specific inhibitor of neutrophil elastase attenuates pulmonary fibrosis after lung injury in mice. *Exp Lung Resear*. 38: 28-36, 2012

5. Kawashima A, Suzuki T, Nishihara F, Kobayashi T, Takaku Y, Nakagome K, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. Effect of formoterol on eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8-stimulated neutrophils. *Int Arch Allergy Immunol*. 2:10-15, 2013

6. Iseki C, Furuta T, Suzuki M, Koyama S, Suzuki K, Suzuki T, Kaneko A, Mitsuma T. Acupuncture alleviated the non-motor symptoms of Parkinson disease including pain, depression and autonomic symptoms. *Case reports in Neurological Medicine* 2014 in press.

[学会発表](計 2 件)

1. PAR-2 agonists induce TGF- β and EMT leading to lung fibrosis.

European Respiratory Society Barcelona, Spain Sep.7-11, 2013

2. 間質性肺炎におけるPAR-2の役割
第54回日本呼吸器学会総会 東京
2014.4.25-27

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 朋子 (SUZUKI Tomoko)
福島県立医科大学・公私立大学の部局等・
准教授
研究者番号：10400342

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：