

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591171

研究課題名(和文) HB-EGFを中心とした肺線維症・間質性肺炎新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of new remedy for pulmonary fibrosis, focused on HB-EGF

研究代表者

藤田 昌樹 (FUJITA, MASAKI)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：50325461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的としては、HB-EGFの呼吸器疾患における役割、特に肺線維症に対する役割を明らかにし、新規治療開発に結び付ける事であった。

肺線維症におけるHB-EGFの発現は、肺線維化に伴い抑制を受けていることが明らかになった。HB-EGFを強制発現させると線維化が防御できるのではないかという仮説を立て、強制的に発現もしくはタンパクの投与を行うも、はっきりした防御効果は得られなかった。HB-EGFは線維化時には発現が抑制されているが、HB-EGF単独投与では実験肺線維症モデル防御効果は示さないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the role of HB-EGF in respiratory diseases, especially pulmonary fibrosis and to develop new remedy for pulmonary fibrosis.

The expression of HB-EGF was elevated in the bleomycin induced pulmonary fibrosis in inflammation phase. Then the expression was decreased in fibrosis phase. The HB-EGF expression was down-regulated in clinical specimen from the idiopathic pulmonary fibrosis. Therefore, it was revealed that the expression of HB-EGF was down-regulated related to pulmonary fibrosis. We hypothesized that overexpression of HB-EGF might lead to rescue of pulmonary fibrosis. We administered of adenovirus vector of HB-EGF expression or recombinant HB-EGF into bleomycin induced pulmonary fibrosis model. However, the apparent attenuation was not attained. As a result, the expression of HB-EGF was down-regulated in pulmonary fibrosis, but overexpression of HB-EGF did not result in attenuation of pulmonary fibrosis in this study.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺線維症 HB-EGF

## 1. 研究開始当初の背景

HB-EGFはEGFファミリーに属するヘパリン結合性の増殖因子で、EGFRやErbB4といったErbBファミリーの受容体型チロシンキナーゼに結合して、これらを活性化し、HB-EGFは、はじめ膜貫通部位をもった膜結合型タンパク質(proHB-EGF)として合成されてから、種々の刺激に伴って、エクストドメイン・シェディングと呼ばれるメタロプロテアーゼによる酵素的切断を受けることで、その分泌型(sHB-EGF)が細胞外に分泌される。膜結合型が細胞表面でプロテアーゼによって切断されると、EGF様ドメインを含む細胞外ドメインが遊離され、分泌型HB-EGFを生じる。分泌型は、表皮細胞、心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージなど種々の組織、細胞より分泌され、細胞の増殖や分化、炎症反応などに関わっている。膜結合型は分泌型の前駆体であるだけでなく、膜結合型の状態でも生物活性を持っていると考えられている。卵巣がんなどではHB-EGFは高発現を示し、癌の進展に密接な関係があると示されている。しかしながら、呼吸器疾患におけるHB-EGFの役割については明らかではない。呼吸器疾患には難治性疾患が多々存在するが、肺線維症は難治性疾患の代表である。予後不良の疾患であり、根源的な治療が確立されていない。一刻も早い原因の解明と治療法の確立が待たれる。HB-EGFは主任研究者が留学していた施設でも研究がなされており、HB-EGFはII型肺胞上皮細胞増殖因子の可能性が指摘されていた(Am J Respir. Cell Mol Biol 1997;16:379-387)しかし、その後ARDS患者の気管支肺胞洗浄液中のHB-EGFは殆ど検出できないとの発表もあり、研究は進展しなかった(Am J Pathol 2006;169:86-95)。本年になり、小腸穿孔ARDSモデルにおいてHB-EGF投与の有用性が指摘された(J Surg Res 2010;163: 86-95)。これらからは、肺障害については間質性肺炎への治療として有望な印象を持つ。しかし肺線維症、間質性肺炎でのHB-EGFについての基礎的研究は十分になされていない。これらを研究する事により、HB-EGFによる治療開発に結びつく基礎的データが得られると考えた。実際、少数の肺線維症・間質性肺炎の血清HB-EGFを測定してみたところ、異常高値を示しており、病態との何らかの関連が示唆される。現時点では肺線維症、間質性肺炎の治療には手詰まり感が強い。何らかの新規治療が開発される可能性があると考えており、本研究を遂行する。

## 2. 研究の目的

HB-EGFはEGFファミリーに属するヘパリン結合性の増殖因子で、表皮細胞、心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージなど種々の組織、細胞より分泌され、細胞の増殖や分化、炎症反応などに関わっている。しかし、呼吸器疾患における役割は明らかではない。HB-EGFの呼吸器疾患における役割、特

に肺線維症、間質性肺炎に対する役割を明らかにし、新規治療開発に結び付ける。

## 3. 研究の方法

### マウスモデルでの検討

In vivoモデルとして、プレオマイシン投与モデルを使用して、HB-EGFのmRNA発現および蛋白発現について検討した。

論文(Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2003, 29:669-676)で報告したように、プレオマイシンは気管内に投与し、3-4週間後に線維化が得られるモデルだが、実際上は、炎症後に線維化が進行するモデルであり、投与後の経時的なプロフィールについての検討が可能なモデルでもある。

麻酔後に、気管内に0.05unitsのプレオマイシンを投与した。投与後3日後および28日後に、マウス肺組織からmRNAを抽出し、real-time PCRを利用してHB-EGFの発現について検討した。コントロールとしては、生食投与群をコントロールとした。

### ヒト検体での検討

ヒト特異性肺線維症、間質性肺炎生検検体を利用し、ヒト肺生検標本から抽出し、mRNA発現についてreal-time PCR法にて検討を行った。コントロールとしては線維化のない肺癌患者標本とした。

### HB-EGF 強制発現アデノウイルスベクターの作成

HB-EGF強制発現に伴う肺線維症への影響を観察することを目的とし、アデノウイルスベクターを作成した。HB-EGF発現をウエスタンブロットで確認後、293細胞で大量増幅し、 $1 \times 10^9$  pfu/mlまで濃縮した。

実際上のマウスへの投与は、麻酔後に点鼻投与を行った。

### HB-EGF 強制発現に伴う肺線維症への影響

HB-EGF強制発現に伴う肺線維症への影響を観察した。線維化マウスモデルとして、上述のプレオマイシンモデルを用いた。

プレオマイシン投与28日後の線維化完成後のマウスに対して、HB-EGF強制発現を行った。強制発現させるためにアデノウイルスベクター、コントロールとしては空ベクターを用いた。

HB-EGF強制発現後2週間、4週間後に効果判定を行った。線維化の有無について、シリウスレッド染色をはじめとした組織学的検討を行い、線維化への影響を検討した。

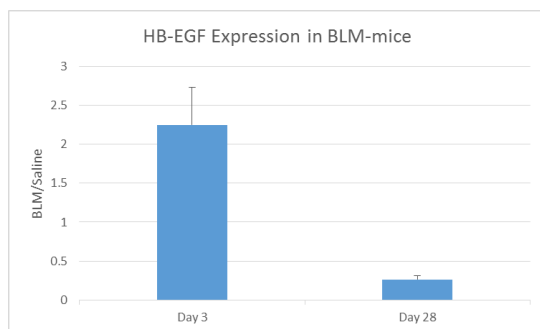
また、Recombinant HB-EGFを購入した。これも線維化マウスモデルを作成後に投与を行い、2週間、4週間後に効果判定を行った。

## 4. 研究成果

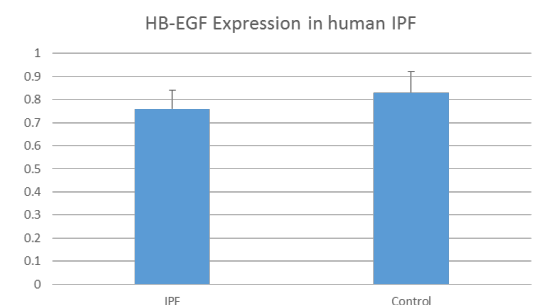
本研究の目的としては、HB-EGFの呼吸器疾患

における役割、特に肺線維症、間質性肺炎に対する役割を明らかにし、新規治療開発に結び付ける事であった。

間質性肺炎における HB-EGF 発現の有無、HB-EGF 強制発現による影響を検討した。プレオマイシン誘起性肺線維症では HB-EGF の発現は早期(炎症期 Day3)では高く、後期(線維化期 Day28)では生食コントロールと比較して発現が低下している結果が得られた。



特発性肺線維症ヒト検体での検討では HB-EGF 発現はコントロールと比較して若干発現が抑制されていた。



このため HB-EGF の発現は肺線維化に伴い、HB-EGF 発現は抑制を受けていることが明らかになった。このため、HB-EGF を強制発現させると線維化が防御できるのではないかという仮説を立てた。HB-EGF 発現アデノウイルスベクター、また recombinant HB-EGF をプレオマイシン誘起肺線維症モデルへ投与し、防御効果を検討した。

HB-EGF アデノウイルスベクターを作成した。ウエスタンブロットで HB-EGF が発現することが証明され、動物実験でも、点鼻投与により、3 - 7 日後にピークを示す発現が得られることが示された。このアデノウイルスベクターを、線維化完成後モデル、プレオマイシン投与後 28 日後のマウスへ点鼻投与を行った。強制発現後 2 週間後および 4 週間後の肺組織では、炎症細胞、肺線維化とも空ベクターと比較して、明らかな変化を認めなかった。はっきりした防御効果は得られなかったものと考えられた。アデノウイルスベクターを再作成するも、同様の結果であった。

アデノウイルスベクターとは別に、recombinant HB-EGF そのものをプレオマイシン誘起肺線維症モデルへ投与し、防御効果を検討した。これもアデノウイルスベクター

と同様で、投与 2 週間後および 4 週間後の肺組織では、炎症細胞、肺線維化ともコントロールと比較して、明らかな変化を認めなかった。recombinant HB-EGF そのものでも、はっきりとした防御効果を認めることはできなかった。

本研究の結果を総括すると、HB-EGF は炎症惹起時に発現が亢進し、線維化時には発現が抑制されている。ヒト肺線維症では炎症は著明ではなく、線維化が中心であり、HB-EGF 発現は抑制されていた。HB-EGF 強制発現および投与では実験肺線維症モデル防御効果は示さなかった。HB-EGF と肺線維化には、何らかの関連は認められるが、HB-EGF 発現だけでは、新規治療開発には結びつかないことが判明した。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 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 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
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  
藤田 昌樹 (FUJITA Masaki)  
福岡大学・医学部・准教授  
研究者番号：50325461

(2)研究分担者  
内野順治 (UCHINO Junji)  
福岡大学・医学部・講師

研究者番号：80432946

(3)連携研究者

田代 尚樹 (TASHIRO Naoki)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：70613884