

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659434

研究課題名(和文) 肺線維症に対する抗線維化ペプチド吸入療法の開発

研究課題名(英文) Development of inhaled therapy with anti-fibrotic peptides for pulmonary fibrosis

研究代表者

西岡 安彦 (NISHIOKA, Yasuhiko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：70274199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：PDGF-BBとPDGFR 受容体の結合阻害活性を持つペプチドをAHB (antigen homology box)モチーフの推定法(Nat Med. 1:894-901, 1995)を用いて設計・合成した。肺線維芽細胞の増殖抑制効果を指標にスクリーニングを行い、PDGF-BB刺激による肺線維芽細胞の増殖を最も強く抑制するペプチドとして、ペプチドNo.3を同定した。蛍光標識したペプチドNo.3は肺線維芽細胞に強く結合した。さらにペプチドNo.3の吸入による抗線維化効果をマウスブレオマイシン肺線維症モデルで確認した。以上からペプチドNo.3は今後の肺線維症治療薬としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We synthesized novel peptides which could inhibit the binding of mouse PDGF-BB to PDGFRbeta. From these peptides, we identified the peptide No.3 showing the strong inhibitory effects of the proliferation of lung fibroblasts in vitro. The FAM-labelled peptide No. 3 strongly bound to lung fibroblasts under a fluorescence microscopy. The administration of peptide No.3 as an inhaled therapy reduced bleomycin-induced lung fibrosis in mice. These results suggest that the peptide might be a novel and promising therapeutic agent for pulmonary fibrosis.

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 ペプチド 吸入療法 PDGF 医療・福祉

1. 研究開始当初の背景

申請者は特発性肺線維症 (IPF) に対する分子標的治療法の開発を目的に、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) 受容体 (PDGFR) 阻害薬であるイマチニブ (グリベック®) に注目し、その抗線維化効果を報告してきた。すなわち、線維化治療のターゲットとして PDGF が有力な候補であることを示した。そこで PDGF をターゲットとした新たな治療法として、リガンド-レセプターの結合をブロックするペプチドを設計し、新たな線維症治療法への応用について検討した。

2. 研究の目的

PDGF/PDGFR のシグナルを阻害するペプチドを合成し、抗線維化効果を有するペプチドを同定する。

3. 研究の方法

リガンドとレセプターの結合に重要な AHB (antigen homology box) の推定法 (Nat Med. 1:894-901, 1995) を用いて、PDGF/PDGFR 結合を阻害する可能性のあるペプチドを合成する。特にこれまでの我々の検討から、PDGF 作用の阻害には PDGF-BB と PDGFRβ の阻害が最も効果的であることを見い出している。そこで、PDGF-BB と PDGFRβ の結合阻害活性を有する可能性のあるペプチドを数種類合成した。これらのペプチドを用いて *in vitro* において肺線維芽細胞の増殖阻害作用を有するペプチドをスクリーニングした。増殖活性の測定には、³H-TdR 取り込み試験を使用した。さらに、FAM 標識したペプチドの、肺線維芽細胞への結合を、蛍光顕微鏡活性およびフローサイトメトリー法にて確認した。さらに、ペプチドの PDGFRβ への結合を、リコンビナント PDGFRβFc を用いて BIACOREX による表面プラズモン共鳴法にて検討した。さらに、*in vivo* での抗線維化効果を検討するため、マウスブレオマイシン肺線維症モデルを作製し、ペプチド吸入による抗線維化効果を検討した。

4. 研究成果

合成したこれらのペプチドを用いて *in vitro* におけるマウス肺線維芽細胞 C57BL/6 の増殖阻害活性を検討した (Figure 1)。PDGF にて誘導される肺線維芽細胞の増殖に対して 10 種類のペプチドを添加した結果、ペプチド No.3 に強い線維芽細胞の増殖抑制効果を認められた。さらにペプチド No.3 の増殖抑制効果の用量依存性を検討した結果 (Figure 2)、3μM 以上の濃度で有意な増殖抑制を示した。一方、ペプチド No.3 処理は肺線維芽細胞の生存率には影響を与えず、増殖抑制効果は細胞傷害による作用ではないと考えられた。次に、ペプチド No.3 の PDGFRβ/PDGFRb 特異的結合を確認するため、PDGF-BB 刺激のみ

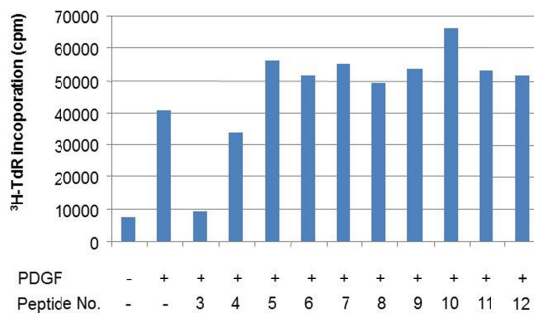


Figure 1 Effect of AHB peptides for murine PDGFRβ/PDGFR-BB on the proliferation of lung fibroblasts in response to PDGF-BB. C57BL/6 murine lung fibroblasts were cultured in RPMI1640 medium containing 10%FBS in 96 well-plate. After serum starvation overnight, cells were stimulated with 10 ng/ml of PDGF-BB in the presence or absence of 5 μM of each peptide. The cells were harvested 72 h later after 18 h-pulsing of ³H-TdR (1 μCi/well).

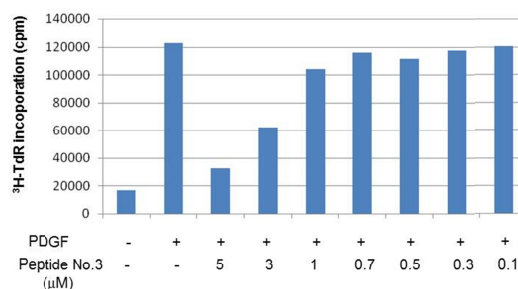


Figure 2 Dose-dependent effect of AHB peptide 3 for murine PDGFRβ/PDGFR-BB on the proliferation of lung fibroblasts in response to PDGF-BB. C57BL/6 murine lung fibroblasts were cultured in RPMI1640 medium containing 10%FBS in 96 well-plate. After serum starvation overnight, cells were stimulated with 10 ng/ml of PDGF-BB in the presence of various concentration of AHB peptide 3. The cells were harvested 72 h later after 18 h-pulsing of ³H-TdR (1 μCi/well).

ならず、PDGF-AA、fibroblast growth factor-2 (FGF-2)、insulin growth factor-1 (IGF-1) 刺激による線維芽細胞増殖に対する効果を検討した (Figure 3)。その結果、肺線維芽細胞は、FGF-2 に比較的強い増殖反応を示したが、PDGF-AA および IGF-1 による増殖反応は軽微なものであった。一方、ペプチド No.3 の添加は、肺線維芽細胞の PDGF-AA および IGF-1 による増殖反応を完全に、また FGF-2 による増殖反応を軽度抑制した。これらの結

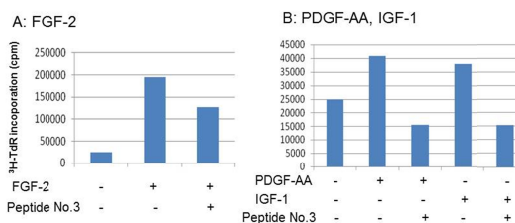


Figure 3 Effect of AHB peptide 3 for murine PDGFRβ/PDGFR-BB on the proliferation of lung fibroblasts in response to FGF-2, PDGF-AA or IGF-1. C57BL/6 murine lung fibroblasts were cultured in RPMI1640 medium containing 10%FBS in 96 well-plate. After serum starvation overnight, cells were stimulated with 10 ng/ml of FGF-2, PDGF-AA or IGF-1 in the presence of 5 μM of AHB peptide 3. The cells were harvested 72 h later after 18 h-pulsing of ³H-TdR (1 μCi/well).

果から、ペプチド No.3 は PDGF-BB/PDGFRβ のみに特異的に結合しているわけではない可能性が示唆された。

そこで、蛍光 (FAM) 標識したペプチドを用いて、肺線維芽細胞に対する結合について検討した。その結果、ペプチド No.3 は、コントロールペプチドに比較して明らかに肺線維芽細胞への強い結合を認められた (Figure 4)。

次にペプチド No.3 の PDGFRb への特異的な結合を観察するため、BIACORE X を用いた表面プラズモン共鳴にペプチド No.3 による

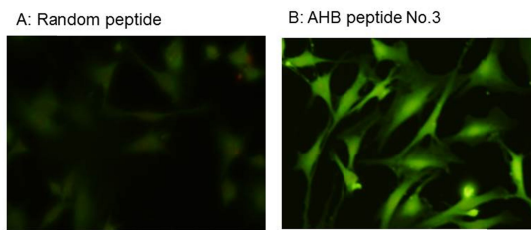


Figure 4 Binding of AHB peptide No.3 for murine PDGFRβ/PDGFRβ-BB to lung fibroblasts. C57BL/6 murine lung fibroblasts were cultured in RPMI1640 medium containing 10%FBS in 96 well-plate. FAM-labelled random peptide or AHB peptide No.3 were added in fibroblast culture. The fluorescence was observed under a fluorescence microscopy (x200).

レコンピナントマウス PDGFR/Fc との特異結合の検討を行った (Figure 5)。その結果、今回の検討では、マウス PDGFR/Fc とペプチド No.3 との間には何らかの非特異的な結合が示唆される結果となった。

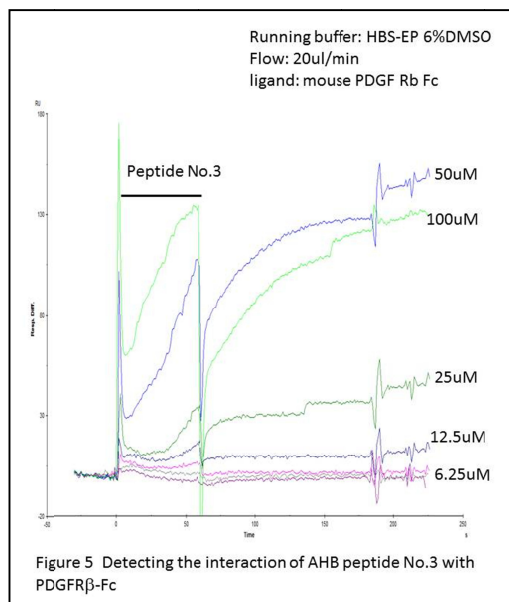


Figure 5 Detecting the interaction of AHB peptide No.3 with PDGFRβ-Fc

一方、ペプチド No.3 の *in vivo* における抗線維化効果について検討した。使用したモデルは、マウスブレオマイシン肺線維症モデルであった。ブレオマイシン 125mg/kg を含む浸透圧ポンプを 8 週齢の C57BL/6 マウス皮下

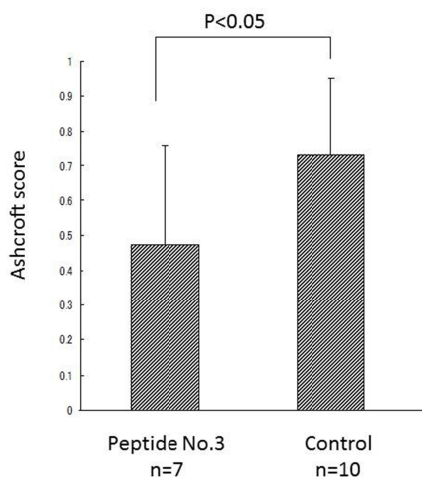


Figure 6 Antifibrotic effects of inhaled therapy with AHB peptide No.3 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. C57BL/6 mice were implanted subcutaneously with miniosmotic pump containing bleomycin (125 mg/kg). AHB peptide No.3 were administered day 14-21. The lung fibrosis was evaluated on day 21 by histological examination using an Ashcroft score.

に移植し、肺線維症モデルを作製した。ペプチド No.3 は、day 14~21 まで、100μg を連日吸入で投与した。その結果、肺線維化スコア (Ashcroft score) で有意に抗線維化効果が確認された。

以上の結果、AHB ペプチド No.3 は、*in vivo* における抗線維化効果を有するペプチドであることが明らかとなった。作用メカニズムについては、PDGF-BB/ PDGFRβ 特異的ではない可能性が示唆されるものの、強い抗線維化効果は治療薬としての可能性を期待させる。今後、さらに詳細な作用メカニズムを検討することで、より効果的なペプチドの合成ならびに投与法の開発が期待される。

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 23 件)

木下勝弘、青野純典、竹崎彰夫、岡崎弘泰、吉嶋輝実、岸昌美、東桃代、岸潤、泉啓介、西岡安彦、ブレオマイシン肺線維症モデルにおける FAK シグナル阻害薬の抗線維化効果、分子呼吸器病、査読無、18 巻、2014、154-157、http://www.sentan.com/cgi-bin/db_n.cgi?mode=view_backno&no=1028

西岡安彦、後東久嗣、肺胞上皮障害と修復、呼吸と循環、査読無、61 巻、2013、1146-1151、<http://ej.islib.jp/ejournal/top-04523458-61-12.html>

Kinoshita K、Aono Y、Azuma M、Kishi J、Takezaki A、Kishi M、Makino H、Okazaki H、Uehara H、Izumi K、Sone S、Nishioka Y、Antifibrotic effects of focal adhesion kinase inhibitor in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice、Am J Respir Cell Mol Biol、査読有、49 巻、2013、536-543、doi: 10.1165/rcmb.2012-02770C

Nishioka Y、Azuma M、Kishi M、Aono Y、Targeting platelet-derived growth factor as a therapeutic approach in pulmonary fibrosis、J Med Invest、査読有、60 巻、2013、175-183、http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol60/index_2.html

西岡安彦、青野純典、Fibrocyte の役割、日本胸部臨床、査読無、72 巻(増)、2013、S186-189、<http://www.kokuseido.co.jp/jc/27213.htm>

西岡安彦、間質性肺炎の診断と治療：最近の進歩、日本臨床内科医会誌、査読無、28 巻、2013、46-50、<http://www.japha.jp/doctor/publish.html>

西岡安彦、青野純典、間質性肺炎と増殖因子、アレルギーの臨床、査読無、443 巻、2013、421-424、http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2013/05/20135_4.html

Matsui S, Hebisawa A, Sakai F, Yamamoto H, Terasaki Y, Kurihara Y, Waseda Y, Kawamura T, Miyashita T, Inoue H, Hata N, Masubuchi H, Sugino K, Kishi J, Kobayashi H, Usui Y, Komazaki Y, Kawabata Y, Ogura T, Immunoglobulin G4-related lung disease: clinicoradiological and pathological features, *Respirology*, 査読有、18 巻、2013、480-487、doi: 10.1111/resp.12016.

岸潤、河野弘、西岡安彦、関節リウマチと間質性肺病変、*リウマチ科*、査読無、49 巻、2013、161-165、<http://www.kahyo.com/item/R201302-492> @

西岡安彦、青野純典、阿部秀一、肺線維症における線維芽細胞の由来、*呼吸器内科*、査読無、23 巻、2013、20-24、<http://www.kahyo.com/item/K0201301-231>

後東久嗣、青野純典、西岡安彦、肺の生体防御機構におけるサーファクタント蛋白 A の役割、*日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌*、査読無、43 巻、2012、9-12、<http://rods777.ddo.jp/~s002/kaimen.htm>

西岡安彦、難治性呼吸器疾患の治療法の開発を目指して、*呼吸*、査読無、31 巻、2012、587-588、<http://www.respiration.jp/>

Homma S, Azuma A, Taniguchi H, Ogura T, Mochiduki Y, Sugiyama Y, Nakata K, Yoshimura K, Takeuchi M, Kudoh S, Japan NAC Clinical Study Group(Nishioka Y), Efficacy of inhaled N-acetylcysteine monotherapy in patients with early stage idiopathic pulmonary fibrosis, *Respirology*, 査読有、17 巻、2012、467-477、doi:10.1111/j.1440-1843.2012.02132.x

Ogawa H, Azuma M, Uehara H, Takahashi T, Nishioka Y, Sone S, Izumi K, Nerve growth factor derived from bronchial epithelium after chronic mite antigen exposure contributes to airway hyperresponsiveness by inducing hyperinnervation, and is inhibited by in vivo siRNA, *Clin Exp Allergy*, 査読有、42 巻、2012、460-470、doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03918.x.

Aono Y, Ledford JG, Mukherjee S, Ogawa H, Nishioka Y, Sone S, Beers MF, Paul W, Noble PW, Wright JR, Surfactant protein-D regulates effector cell function and fibrotic lung remodeling in response to bleomycin injury, *Am J Respir Crit Care Med*, 査読有、185 巻、2012、525-536、doi:10.1164/rccm.201103-0561OC.

Miyake K, Tani K, Kakiuchi S, Suzuka C, Toyoda Y, Kishi J, Tezuka T, Yuasa S,

Hanibuchi M, Aono Y, Nishioka Y, Sone S, Epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor (gefitinib) augments pneumonitis, but attenuates lung fibrosis in response to radiation injury in rats, *J Med Invest*, 査読有、59 巻、2012、174-185、http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol59/index_1.html

青野純典、西岡安彦、膠原病と関連したびまん性肺疾患、*総合臨床*、査読無、60 巻、2011、2463-2469、<http://www.nagaishoten.co.jp/search/sogo/A201112.html>

西岡安彦、Gremlin と特発性間質性肺炎、*呼吸*、査読無、30 巻、2011、955-958、<http://www.respiration.jp/>

Li Q, Wang W, Yamada T, Matsumoto K, Sakai K, Bando Y, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Iwakiri S, Itoi K, Utsugi T, Yasumoto K, Yano S, Pleural mesothelioma instigates tumor-associated fibroblasts to promote progression via a malignant cytokine network, *Am J Pathol*, 査読有、179 巻、2011、1483-1493、doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.060.

Batmunkh R, Nishioka Y, Aono Y, Azuma M, Kinoshita K, Kishi J, Makino H, Kishi M, Takezaki A, Sone S, CCN6 as a profibrotic mediator that stimulates the proliferation of lung fibroblasts via the integrin 1/focal adhesion kinase pathway, *J Med Invest*, 査読有、58 巻、2011、188-196、http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol58/index_2.html

⑲ Kishi J, Nishioka Y, Kuwahara T, Kakiuchi S, Azuma M, Aono Y, Makino H, Kinoshita K, Kishi M, Batmunkh R, Uehara H, Izumi K, Sone S, Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice, *Eur Respir J*, 査読有、38 巻、2011、415-424、doi: 10.1183/09031936.00070610.

⑳ Taniguchi H, Kondoh Y, Ebina M, Azuma A, Ogura T, Taguchi Y, Suga M, Takahashi H, Nakata K, Sato A, Sugiyama Y, Kudoh S, Nukiwa T, Pirfenidone Clinical Study Group in Japan (Nishioka Y), The clinical significance of 5% change in vital capacity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: extended analysis of the pirfenidone trial, *Respir Res*, 査読有、12 巻、2011、93-101、doi: 10.1186/1465-9921-12-93.

㉑ Ogawa H, Azuma M, Muto S, Nishioka Y, Honjo A, Tezuka T, Uehara H, Izumi K, Itai A, Sone S, I B kinase inhibitor IMD-0354 suppresses airway

remodelling in a Dermatophagoides pteronyssinus-sensitized mouse model of chronic asthma, Clin Exp Allergy, 査読有、41 巻、2011、104-115、doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03564.x.

〔学会発表〕(計 20 件)

西岡安彦、特発性間質性肺炎の診断と治療-最近の話題-、第 49 回日本内科学会四国支部生涯教育講演会(教育講演)、2013 年 12 月 1 日、サンポートホール高松(香川県)

Yoshinori Aono, Yasuhiko Nishioka 他、Fibrocyte regulates lung fibroblast activation via producing growth factors. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. 2013 年 11 月 13 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

Katsuhiko Kinoshita, Yasuhiko Nishioka 他、Antifibrotic effects of focal adhesion kinase inhibitor in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. 2013 年 11 月 12 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

Yasuhiko Nishioka 他、Fibrocytes regulate function of lung fibroblasts by producing profibrotic growth factors, ATS 2013 Conference, 2013 年 5 月 22 日、Pennsylvania Convention Center (U.S.A.)

青野純典、西岡安彦 他、DNA マイクロアレイ法を用いた Fibrocyte と単球の遺伝子発現解析の検討、第 53 回日本呼吸器学会学術講演会(ミニシンポジウム)、2013 年 4 月 20 日、東京国際フォーラム(東京都)

阿部秀一、岸潤、西岡安彦 他、肺線維症における増殖因子産生を介した fibrocyte の役割と検討、第 53 回日本呼吸器学会学術講演会(ミニシンポジウム)、2013 年 4 月 20 日、東京国際フォーラム(東京都)

埴淵昌毅、西岡安彦 他、当院における Idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis(IPPFE)症例の検討-IgG4 関連疾患との関連性-、第 110 回日本内科学会講演会、2013 年 4 月 13 日、東京国際フォーラム(東京都)

西岡安彦、難治性呼吸器疾患の分子病態解明と新規治療法の開発、第 246 回徳島医学会学術集会(招待講演)、2013 年 2 月 3 日、長井記念ホール(徳島県)

西岡安彦、呼吸器疾患に対する薬物療法の進歩と DDS から見た課題、創剤フォーラム第 18 回若手研究会(招待講演)、2012 年 11 月 17 日、長井記念ホール(徳島県)

西岡安彦、特発性間質性肺炎の治療標的：線維芽細胞と増殖因子シグナル、第

20 回肺リモデリング研究会(招待講演)、2012 年 10 月 20 日、東京ステーションコンファレンス(東京都)

西岡安彦、間質性肺炎の診断と治療：最近の進歩、第 26 回日本臨床内科医学会(教育講演)、2012 年 10 月 7 日、ホテルクレメント徳島(徳島県)

西岡安彦、間質性肺炎診療の現状と課題、第 47 回日本呼吸器学会中国・四国地方会呼吸器セミナー、2012 年 7 月 21 日、海峡メッセ下関(山口県)

Yoshinori Aono, Yasuhiko Nishioka 他、Different functions of PDGF receptor-alpha and beta in lung fibrosis、ATS 2012 International Conference, 2012 年 5 月 22 日、San Francisco (U.S.A.)

青野純典、西岡安彦 他、肺損傷・修復と SP-D:抗線維化の視点から、第 52 回日本呼吸器学会学術講演会(シンポジウム)、2012 年 4 月 22 日、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

岸昌美、東桃代、岸潤、西岡安彦 他、当院におけるピルフェニドン投与症例の検討、第 52 回日本呼吸器学会学術講演会、2012 年 4 月 20 日、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

阿部秀一、東桃代、岸潤、西岡安彦 他、Fibrocyte の肺線維芽細胞機能に及ぼす効果の検討、第 52 回日本呼吸器学会学術講演会、2012 年 4 月 20 日、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

柿内聡司、西岡安彦 他、mTOR 阻害剤投与症例における間質性肺障害の臨床的特徴、第 109 回日本内科学会総会・講演会、2012 年 4 月 15 日、みやこめっせ(京都府)

Yoshinori Aono, Yasuhiko Nishioka 他、SP-D attenuates bleomycin induced lung fibrosis via regulating recruitment and activation of macrophages and fibrocytes、ATS 2011 International Conference, 2011 年 5 月 18 日、Denver(U.S.A.)

Katsuhiko Kinoshita, Yasuhiko Nishioka, Momoyo Azuma 他、Antifibrotic effects of focal adhesion kinase inhibitor in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice、ATS 2011 International Conference, 2011 年 5 月 18 日、Denver(U.S.A.)

Momoyo Azuma, Yasuhiko Nishioka, Jun Kishi 他、The role of sphingosine 1-phosphate (SIP) signaling in pulmonary fibrosis、ATS 2011 International Conference, 2011 年 5 月 15 日、Denver(U.S.A.)

〔図書〕(計 7 件)

西岡安彦 他、克誠堂出版株式会社、特発性間質性肺炎の治療と管理、2013、218

(177-184)

西岡安彦 他、朝倉書店、内科学第10版、
2013、2404 (806-808)

西岡安彦 他、医歯薬出版株式会社、医学
のあゆみ 呼吸器疾患 -state of arts
Ver.6、2013、520 (23-25)

西岡安彦 他、ヌーヴェルヒロカワ、臨床
病態学1巻、2013、640 (231-233)

西岡安彦 他、南江堂、呼吸器疾患最新の
治療 2013-2015、2013、513 (97-101)

西岡安彦 他、中外医学社、Annual Review
2013 呼吸器、2013、294 (28-33)

西岡安彦 他、メジカルビュー社、間質性
肺炎を究める、2012、304 (86-95)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西岡 安彦 (NISHIOKA, Yasuhiko)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：70274199

(2) 研究分担者

岸 潤 (KISHI, Jun)

徳島大学・大学病院・助手

研究者番号：20437635

東 桃代 (AZUMA, Momoyo)

徳島大学・大学病院・特任助教

研究者番号：10403750