

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860649

研究課題名(和文) 間質性肺疾患の新規血清マーカーの開発と革新的分子標的治療法の確立

研究課題名(英文) Development of novel serum marker and treatment for interstitial lung diseases

## 研究代表者

角川 智之 (KAKUGAWA, Tomoyuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：90570953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：HSP47はコラーゲン合成に必要な不可欠な蛋白質であるが、他方、各種線維化疾患においては線維化進展を促進し負の生理作用をもたらす。我々の検討結果では、AIP、特発性肺線維症(IPF)の急性増悪、薬剤性肺炎のDADパターンでは血清中HSP47が著明高値を示すのに対し、安定しているIPFやCOP、NSIPなどでは健常人と同等の値しか示さないことが明らかとなった。肺組織中から血液中に漏出したHSP47蛋白を測定することにより、肺組織中のHSP47発現量を推定することができ、各種間質性肺疾患の鑑別診断や活動性の把握、予後予測を行うことができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Heat shock protein 47 (HSP47), a collagen-specific molecular chaperone, is essential for the biosynthesis and secretion of collagen molecules. Previous studies of various experimental diseases affecting the lung have shown that there is a close association between increased expression of HSP47 and excessive accumulation of collagen. In our study, serum HSP47 levels were significantly higher in patients with acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis, acute interstitial pneumonia, and drug induced lung disease with diffuse alveolar damage (DAD) pattern than those in patients with stable idiopathic pulmonary fibrosis, nonspecific interstitial pneumonia, cryptogenic organizing pneumonia, and healthy volunteers, suggesting that underlying fibrogenic mechanisms involving HSP47 differ in the two conditions. Elevation of serum HSP47 might be due to distinctive characteristics of DAD. DAD changes may possibly induce leakage of HSP47 protein into the extracellular matrix.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：特発性間質性肺炎 特発性肺線維症 急性増悪 バイオマーカー HSP47 急性間質性肺炎 薬剤性肺炎

### 1. 研究開始当初の背景

間質性肺疾患は原因不明の特発性と何らかの原因に続発するものとに分けることができ、更にいくつかの病型に分類される。それぞれ治療法や予後が異なるため早期の確定診断が必要である。間質性肺疾患の既存血清マーカーとしては、KL-6、SP-D、SP-A、LDHがあり、活動性の指標としても有用であるが、呼吸機能検査に比べると有用性は低いと認識されている。また、これらの既存血清マーカーは間質性肺疾患以外の呼吸器疾患においてもしばしば高値となり、更には間質性肺疾患の病型分類の指標とはならない。一方、病理組織検査は診断の正確性については高いが、被検者にとって大きな侵襲を伴うため危険性が高く、また広く一般的に施行できないという欠点がある。このような現状のもと、病理組織検査の結果をより正確に反映し、活動性の把握および予後予測を行うことができる感度の高い血清バイオマーカーが希求されている。

### 2. 研究の目的

この問題を解決するべく本研究課題では、間質性肺疾患のバイオマーカーとして Heat shock protein (HSP) 47 の有用性を提案し、実地臨床での応用実現を目指し、本研究を計画した。報告者らは、これまでに HSP47 は線維化病変局所において特異的に強く発現し、しかもその発現量は間質性肺疾患の予後を予測する因子であることを報告してきた。しかし、組織局所における HSP47 発現量を定量するためには、従来の方法では線維化臓器を生検する必要があった。特に間質性肺疾患の場合は外科的肺生検が必要であるが、患者にとって大きな侵襲を伴うため危険性が高く、また広く一般的に施行できないという欠点がある。そこで我々は、肺組織中から血液中に漏出してきた HSP47 蛋白を測定することにより、肺組織中の HSP47 発現量を推定することができ、各種間質性肺疾患の鑑別診断や活動性の把握、予後予測を行うことができるのではないかとこの着想に至り、検討を行った。

### 3. 研究の方法

当院で間質性肺疾患および対照疾患と診断された症例の血清を収集し、血清中 HSP47 濃度測定を行った。血清中 HSP47 濃度と各種臨床所見との相関について統計学的解析を行った。特に、a) 間質性肺疾患の各種病型および間質性肺疾患と鑑別すべき他疾患における有意差やカットオフ値、感度・特異度の解析、b) 疾患活動性・重症度や治療反応性、予後との相関について解析を行った。具体的には以下のように検討を行った。

(1) 安定した特発性肺線維症 (IPF : idiopathic pulmonary fibrosis) 患者 33 名と IPF 急性増悪 (AE-IPF : acute exacerbation of IPF) 患者 20 名を対象とし、血清中の HSP47 濃度を測定した。また、安定した IPF 患者の外科的肺生検

組織と IPF 急性増悪患者の剖検肺組織での HSP47 発現を免疫組織化学的に検討した。

(2) 薬剤性肺炎患者 47 名の血清中 HSP47 濃度を測定した。薬剤性肺炎は胸部 high-resolution CT (HRCT) で organizing pneumonia (OP) パターン (n = 4)、nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) パターン (n = 24)、hypersensitivity pneumonitis (HP) パターン (n = 11)、diffuse alveolar damage (DAD) パターン (n = 8) の 4 パターンに分けて解析を行った。また、DAD パターン薬剤性肺炎の剖検肺組織での HSP47 発現を免疫組織化学的に検討した。

(3) 病理学的に確定診断された特発性間質性肺炎患者での血清中 HSP47 濃度測定を行った。急性間質性肺炎 (AIP : acute interstitial pneumonia) (n = 9)、特発性器質化肺炎 (COP : cryptogenic organizing pneumonia) (n = 12)、特発性肺線維症 (IPF) (n = 19) および健常成人 (n = 19) での血清中 HSP47 濃度測定を行い、各群間での比較を行った。また、AIP の剖検肺組織での HSP47 発現を免疫組織化学的に検討した。

### 4. 研究成果

(1) IPF 患者血清中 HSP47 濃度は、安定期と比較して急性増悪時に有意に上昇していた。カットオフ値を 600 pg/mL とすることで、安定期と急性増悪時を感度 100%、特異度 93.9% で鑑別することができた。また、安定した IPF 患者の外科的肺生検組織 (病理学的に usual interstitial pneumonia を呈していた) と比較して、急性増悪の剖検肺組織 (病理学的に DAD を呈していた) では HSP47 発現が著明に増強していた。

(2) DAD パターンの薬剤性肺炎では他のパターンと比較して血清中 HSP47 濃度が有意に高値を示した。カットオフ値を 1711.5 pg/mL とすると感度 87.5%、特異度 97.4% で DAD パターンとそれ以外のパターンを鑑別することができた。DAD パターン薬剤性肺炎の剖検肺組織では、HSP47 発現が著明に亢進していた。

(3) AIP 患者血清中 HSP47 濃度は、COP、IPF、NSIP、健常人と比較して有意に上昇していた。一方では、COP、IPF、NSIP、健常人の各群間では血清中 HSP47 濃度は有意差は認めなかった。カットオフ値を 859.3 pg/mL とすると、感度 100%、特異度 98.5% で AIP とそれ以外とを鑑別することができた。AIP の剖検肺組織 (病理学的に DAD を呈していた) では、HSP47 発現が著明に亢進していた。

AIP や IPF の急性増悪、薬剤性肺炎の DAD パターンにて特異的に血清中 HSP47 値上昇がみられることが分かったが、これらに共通する病態は、いずれも病理学的に DAD をきたすことが多いとされていることである。これまでの検討結果から、血清中 HSP47 は病理学的に DAD をきたす肺疾患の特異的マーカーである可能性が示唆されている。

DAD をきたす肺疾患で特異的に血清中

HSP47 が著明に上昇する機序に関しては、現段階では推測の域を出ないが、以下のようなものが考えられる。一般に HSP47 は細胞内に限局して存在し、細胞外には分泌されない蛋白と考えられている。しかし、DAD では著明な炎症と線維化が同時にみられることが特徴であり、肺胞上皮細胞傷害も顕著にみられる。これらの細胞傷害により、細胞内に高発現した HSP47 が細胞外に漏出してくる機序が考えられる。また、DAD の特徴として血管透過性の亢進が挙げられるが、細胞外に漏出してきた HSP47 が、DAD 肺組織での血管透過性亢進により血中に漏出しやすい状態となっているのかもしれない。しかし、詳細な機序に関してはまだ十分に明らかにされておらず、今後更なる検討が望まれる。

これまでの検討結果から、血清中 HSP47 は病理学的に DAD をきたす肺疾患の特異的マーカーである可能性が示唆されている。しかし、現段階ではごく少数例での検討にとどまるため、実臨床で本当に有用なマーカーとなりうるかどうかについては、今後症例数を大幅に増やし HSP47 発現動態の詳細な解析を行うことにより、更なる検証を行う必要がある。

HSP47 はコラーゲン合成に必要不可欠な蛋白質であるため、HSP47 を抑制することにより細胞内でのコラーゲン合成を阻害し、線維化の進行を抑制することができると考えられる。実際、これまでに HSP47 に対する antisense oligodeoxynucleotides や small interfering ribonucleic acid (siRNA) を用いることにより、HSP47 発現を阻害し、線維化進行を抑制することができたとの報告が、特に腎臓領域の線維化疾患モデルで相次いでいる (Obata et al. *Acta Biomater* 2012)。本研究代表者らもプレオマイシン肺線維症モデルマウスにて pirfenidone が HSP47 発現抑制を通して抗線維化作用を発揮することを報告した (Kakugawa et al. *Eur Respir J* 2004)。従って、HSP47 はこれまで有効な治療法がなかった難治性肺線維化疾患の新たな分子標的治療のターゲットとなり得ると考えられた。今後は、肺へ選択的に HSP47 siRNA を送達することのできる肺指向性遺伝子ベクターを用いた肺組織局所における HSP47 発現制御法を確立し、更にプレオマイシン肺線維症モデルや急性肺損傷モデルマウスにおける治療実験を行い、線維化抑制効果について解析する予定である。

#### 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 4 件)

1. Kakugawa T, Yokota S, Ishimatsu Y, Hayashi T, Nakashima S, Hara S, Sakamoto N, Kubota H, Mine M, Matsuoka Y, et al: Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute

interstitial pneumonia. *BMC Pulm Med* 2014, 14: 48. 査読有

DOI: 10.1186/1471-2466-14-48.

2. Kakugawa T, Yokota S, Ishimatsu Y, Hayashi T, Nakashima S, Hara S, Sakamoto N, Matsuoka Y, Kubota H, Mine M, et al: Serum heat shock protein 47 levels in patients with drug-induced lung disease. *Respir Res* 2013, 14: 133. 査読有

DOI: 10.1186/1465-9921-14-133.

3. Kakugawa T, Yokota S, Ishimatsu Y, Hayashi T, Nakashima S, Hara S, Sakamoto N, Kubota H, Mine M, Matsuoka Y, et al: Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Stress Chaperones* 2013, 18: 581-590. 査読有

DOI: 10.1007/s12192-013-0411-5.

4. 角川智之: 急性間質性肺炎のバイオマーカー ~ HSP47 を中心に ~. 分子呼吸器病 2015. 19 巻 1 号 70 頁 ~ 72 頁 査読無し

[学会発表](計 4 件)

1. Tomoyuki Kakugawa, et al. Expression of heat shock protein 47 in chronic hypersensitivity pneumonitis. European Respiratory Society International Congress 2015. 2015 年 09 月 03 日 ~ 2015 年 09 月 07 日. アムステルダム(オランダ)
2. 角川 智之. 薬剤性肺障害における血清中 HSP47 の検討. 第 111 回日本内科学会学術講演会. 2014 年 4 月 11 日 ~ 4 月 13 日. 東京国際フォーラム(東京)
3. 角川 智之. 日常診療における新しいバイオマーカーの有用性・薬剤性肺障害のバイオマーカー. 2014 年 12 月 04 日 ~ 2014 年 12 月 06 日. 第 35 回日本臨床薬理学会学術総会. ひめぎんホール(松山市)
4. Tomoyuki Kakugawa, et al. Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会. 2013 年 04 月 19 日 ~ 21 日. 東京国際フォーラム(東京)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 急性肺損傷診断方法  
発明者: 角川智之、他 1 名  
権利者: 長崎大学、札幌医科大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2012/053174  
出願年月日: 2012-02-10  
国内外の別: 日本、欧州、香港

取得状況(計 1 件)

名称: 急性肺損傷診断方法

発明者：角川智之、他 1 名  
権利者：長崎大学、札幌医科大学  
種類：特許  
番号：ZL201280014503.3  
取得年月日：2016-01-27  
国内外の別：中国

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

角川 智之 ( KAKUGAWA Tomoyuki )  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・  
助教

研究者番号：90570953