

平成30年6月14日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461200

研究課題名(和文) 上皮間葉転換(EMT)を標的とした特発性肺線維症治療薬の新規開発

研究課題名(英文) EMT inhibitor for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

高橋 史行 (Takahashi, Fumiyuki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70327823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、特発性肺線維症(IPF)における肺線維化の機序に上皮間葉転換(EMT)の重要性が示唆されているが、いまだにEMTを標的とした有効な治療法の開発には至っていない。本研究において、我々はヒト肺胞上皮由来であるA549細胞をTGF- β で刺激してEMTを誘導し、このIn vitroでのEMTを抑制する薬剤スクリーニングの結果、強い抑制効果を有するEMT阻害剤を同定した。本薬剤はブレオマイシン経静脈的投与によるIn vivo肺線維症マウスモデルにおいても肺線維化を有意に抑制した。EMT阻害剤は肺胞上皮細胞におけるTGF- β 誘導性EMTを抑制することより、IPF治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that transforming growth factor (TGF) β -mediated epithelial-mesenchymal transition (EMT) of alveolar epithelial cells contributes to the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). However, no agents which can target EMT have not been developed for the treatment of IPF. Here, we established the in vitro models of EMT of alveolar epithelial cells suitable for high-throughput screening of antifibrotic agents for IPF. We found that drug candidate has inhibitory effect on TGF- β -mediated EMT of alveolar epithelial cells in vitro. We also have tested this drug for antifibrotic effect in murine pulmonary fibrosis model induced by bleomycin injection, and found that this drug has antifibrotic activity in vivo. These data suggest that EMT inhibitor may be promising and novel anti-fibrotic agent for the prevention of IPF.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：特発性肺線維症 上皮間葉転換 肺胞上皮 肺線維症マウスモデル ブレオマイシン

1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎は、肺胞隔壁(間質)を病変の主座とする原因不明のびまん性肺疾患であり、国の難病(特定疾患)に指定されている。特発性間質性肺炎は、罹患率が10万人あたり11.8人と報告されており、この半数以上は慢性かつ進行性の経過を辿り、高度の肺線維化および呼吸不全をきたす極めて予後不良疾患である特発性肺線維症(Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF)に分類される。

IPF患者の確定診断後の平均生存期間は28~52ヶ月であり、根本的な治療法は無く、副腎皮質ステロイド剤や免疫抑制剤が炎症を軽減させる目的で使用されていたが、その有効性は証明されていない。

近年、IPF患者における抗線維化薬として、ピルフェニドンとニンテダニブが承認許可され、実診療で使用されており、ある一定の効果は認めているが、いまだにIPF患者の予後は極めて不良である。我々、呼吸器診療に携わる臨床医、および研究者にとって、新規のIPF治療薬を開発することは社会的にも喫緊の課題である。

IPFの病態では、肺胞を構成する上皮細胞や肺胞隔壁(間質)部分が傷害を受けると、その部位に間質の線維芽細胞が増殖、浸潤、線維化し、線維芽細胞巣(Fibroblastic foci)が形成される。近年、この線維化部位におけるII型肺胞上皮細胞が上皮間葉転換(Epithelial mesenchymal transition; EMT)を起こすことにより間葉系細胞としての能力を獲得し、細胞浸潤能獲得や細胞外マトリックス(Extra-cellular matrix; ECM)の産生が増加することで、線維化およびFibroblastic fociの形成を促進することが示唆されている。これらの知見は、IPFの線維化進行抑制および治療に対して、EMTをターゲットとした薬剤の開発は有効である可能性を示唆している。

Fibroblastic fociは、生体内の多数多量の細胞、ECM蛋白、増殖因子等のサイトカイン、ケモカイン、更には新生血管が関与した複雑なプロセスを経て形成されるものであり、生体外で全く同一の構造体を構築することは極めて困難である。そこで我々は、*In vitro*で肺胞上皮細胞にTGF- β によってEMTを誘導し、間葉系細胞の生成やECMを産生するcell-based assayシステムを用いて、EMT阻害作用を示す新規IPF治療の候補薬剤のスクリーニングを行っている。

2. 研究の目的

現在、極めて予後不良な疾患であるIPFに対して、新規治療候補薬を探索する為に、*In vitro*で肺胞上皮細胞にEMTを誘導するcell-based assayシステムを用いて、EMT阻害作用を有する候補薬剤をスクリーニング

する。そして、肺胞上皮細胞におけるEMT誘導による上皮系および間葉系マーカーの発現変化の抑制効果を確認し、候補薬剤のEMT阻害作用の薬理的機序や標的因子を詳細に解析する。また、これらのスクリーニングによって得られた候補薬剤について、プレオマイシン肺線維症モデルマウスを用いて、*In vivo*実験動物モデルによる生体内循環系を通じた薬効評価も行い、IPFに対して治療効果が期待される薬剤を同定・評価する。そして肺線維症におけるEMT阻害剤の有用性を示すことを、本研究の目的とする。

3. 研究の方法

下記のように、ヒト肺胞上皮由来細胞であるA549細胞を用いて、EMT阻害による薬剤ハイスループット・スクリーニングによりIPF治療候補薬を選定する。そしてEMT阻害機序および標的因子を解析し、また*In vivo*実験動物モデルによる薬効評価システムも用いてIPFに対して治療効果が期待される薬剤を選択・評価し、肺線維症におけるEMT阻害剤の有用性を検討する。

ヒト肺胞上皮由来 A549 細胞における EMT 誘導および EMT を阻害する薬剤のスクリーニング

ヒト肺胞上皮由来であるA549細胞においてTGF- β 刺激によりEMTを誘導する。また細胞毒性も同時に評価し、EMT阻害効果を示す薬剤をハイスループットにスクリーニングする。EMTの評価は細胞形態変化、F-Actinの再構成、定量的PCR(qPCR)あるいはウエスタンブロットによる上皮系および間葉系マーカーの発現の検討で行う。ECM産生についてはFibronectinやVimentinなどの免疫蛍光染色も行い、同時に評価する。

細胞遊走能の評価

遊走能に関しては、Wound Healing Assayにより評価した。A549細胞を播種48時間後にチップで傷つけ、候補薬剤の存在下でTGF- β による刺激を行い、48時間後に傷面積の評価を行う。

EMT 阻害作用の薬理的機序の解析

ヒト肺胞上皮細胞A549のEMTに伴う遺伝子発現変化をマイクロアレイで解析する。そして上記の薬剤スクリーニングによりEMT阻害効果を示した候補薬のEMT関連遺伝子群、とくにSnail, Slug, Twist, ZEB1などの代表的なEMT誘導因子の発現に及ぼす影響を解析する。またウエスタンブロットによるSmad2のリン酸化などTGF- β pathway関連因子の抑制効果も同時に検討する。

候補薬剤の標的因子の同定・蛋白解析

機能性ナノ磁性微粒子(FGビーズ)も用いて、候補薬剤の標的因子・蛋白の同定・解析

も試みる。ビーズ固定のため非活性側鎖を確認し、固定反応のため構造変換を行う。ビーズ固定した薬剤と EMT を誘導した A549 細胞および Control 細胞のタンパク抽出液を混合し、結合反応、磁気分離、洗浄、標的蛋白の溶出を行う。そして SDS-PAGE 後に Transfer した membrane で個別に特異的抗体でウエスタンブロットを施行する。同定された薬剤の候補標的因子については siRNA で knockdown し、EMT に直接関与しているかどうかを確認する。

肺線維症モデルマウスにおける線維化抑制効果の検討

我々は現在までにブレオマイシン (Bleomycin; BLM) の経気道的投与により、マウスに肺線維化病変を誘導する *In vivo* モデルを確立している (Takahashi F. et al, *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001)。本研究においては、12 週齢の ICR マウスに 10 mg/kg/day の BLM を 5 日間連続で尾静脈より経静脈的に投与し、Day 23 においてマウスを Sacrifice し、摘出した肺組織は、病理標本作製、コラーゲン含有量の測定、及びタンパク抽出に用いた。病理学的評価としてはヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、マッソン・トリクローム (MT) 染色を行い、Ashcroft score よりスコア化した (Ashcroft T, et al. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *Journal of clinical pathology.* 1988;41:467-70.)。肺でのコラーゲン含有量については Sircol Collagen Assay を用いて定量・評価し、これらを総合して肺病変、線維化の評価を行う。

このモデルマウスに候補薬剤を投与し、肺線維化抑制効果を上記の Ashcroft score による病理学的評価やコラーゲン定量などで評価し、EMT マーカーも qPCR やウエスタンブロット、免疫組織染色 (IHC) で検討する。また肺胞上皮マーカーや間葉系マーカーである Fibronectin などの免疫染色も施行し、上記薬剤の *In vivo* での EMT 抑制効果も同時に評価する。

IPF 患者の肺組織収集および線維化肺病巣における EMT の解析

IPF における肺線維化の進行抑制および治療に対して EMT 阻害が有効な手段であることを検証する為、また個々の IPF 患者における EMT 病態を個別に評価するために、線維化の進行が強く見られる IPF 患者の肺病巣組織検体を収集し、IHC などで EMT マーカーや関連因子の発現解析を行い、IPF 患者の肺線維化病変の個別の EMT プロファイルを解析する。

4. 研究成果

IPF は、肺において高度に線維化が進行する原因不明の難治性疾患である。近年、IPF

における肺線維化の機序に EMT の重要性が示唆されているが、いまだに EMT を標的とした有効な IPF 治療法の開発・臨床応用には至っていない。本研究において、我々はヒト肺胞上皮由来である A549 細胞で TGF- β によって EMT を誘導し、EMT 阻害を示す薬剤をハイスループットにスクリーニングした。

A549 を 5ng/ μ l の TGF- β 2 で刺激すると、著明な細胞形態の紡錘形変化、およびウエスタンブロットにおいて上皮系マーカーである E-cadherin の発現消失、間葉系マーカーである N-cadherin 及び細胞外マトリックス蛋白である Fibronectin、IV 型 Collagen の発現獲得を認め、TGF- β 誘導性の EMT に矛盾しない所見と考えられた。そして、この *In vitro* での EMT を用いた薬剤スクリーニングの結果、強い EMT 阻害作用を有する候補薬剤を同定した。

本薬剤はヒト肺胞上皮細胞 A549 における TGF- β 誘導性の EMT を著明に抑制した。具体的には、上記の A549 を用いた *In vitro* での TGF- β 誘導性 EMT の系に薬剤を 50~200 μ M、それぞれの濃度で TGF- β 2 と同時に添加、または TGF- β 2 で刺激した 24 時間後に添加した。薬剤投与 48 時間後に RNA 及びタンパクを抽出し、EMT 阻害効果を上皮系、間葉系マーカーの定量的 PCR、ウエスタンブロット法、及び免疫蛍光細胞染色で確認した。コントロールとして TGF- β 阻害剤である SB431542 も使用した。本薬剤は TGF- β により誘導された Fibronectin, N-Cadherin, Collagen4A1 の発現を抑制した。またウエスタンブロットによる蛋白レベルでの確認においても TGF- β により誘導された E-Cadherin の発現喪失、Fibronectin, N-Cadherin, TypeIV Collagen の発現上昇を Reverse した。

細胞遊走能は Wound Healing Assay により検討した。上皮細胞が EMT を引き起こすと、細胞形態変化や上皮系・間葉系マーカーの発現変化に加えて、細胞遊走能も亢進することが知られているが、A549 を 5ng/ μ l の TGF- β 2 で刺激すると、著明な細胞遊走能の亢進を認め、EMT に矛盾しない所見と考えられた。そして、この EMT により亢進した細胞遊走能は本薬剤の添加で有意に抑制された。

本薬剤の TGF- β pathway に対する効果を検討するために Smad2 のリン酸化をウエスタンブロット法で評価した。また Image analyzer を用いて、リン酸化 Smad2 のバンドの Intensity を測定し、total Smad2 との比率を算出し、薬剤による Smad2 のリン酸化抑制効果を検討したところ、本薬剤はヒト肺胞上皮由来である A549 細胞において、TGF- β 誘導性の Smad2 リン酸化を著明に抑制した。また本薬剤は、Slug, ZEB1 などの TGF- β pathway における重要な EMT 誘導因子の発現や TGF- β 1 あるいは TGF- β 2 の発現も抑制した。これらの結果は、ヒト肺胞上皮細胞の EMT における本薬剤の TGF- β pathway に対する抑制効果を強く示唆していると考え

られた。

ICR マウスにブレオマイシン (BLM) 10mg/kg を 5 日間連続で経静脈的に投与し、肺線維症モデルを作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、マッソン・トリクローム (MT) 染色を行い、Ashcroft score によるスコア化では、BLM 投与により有意な線維化の所見を認めた。In vivo での本薬剤の治療効果を検証するために、BLM 投与開始日から 8 日目より 20 日目まで薬剤 (400mg/kg) の経口連続投与を施行し、23 日目に肺組織を採取した。

本薬剤の投与により、HE 染色および MT 染色による病理学的所見でも有意に肺線維化の抑制が認められた。また Sircol Collagen Assay を用いた肺組織中の Collagen 含有量は有意に抑制され、Fibronectin の免疫組織染色でも本薬剤の投与は Fibronectin の発現を著明に抑制した。Smad2 のリン酸化もウエスタンブロットおよびバンドの Intensity 測定により検討したところ、BLM 投与により顕著に Smad2 リン酸化が認められ、この活性化は本薬剤の経口投与により有意に抑制された。

これらの結果より、本薬剤は In vivo 肺線維症マウスモデルにおいても、Collagen や Fibronectin の産生および Smad2 のリン酸化を抑制することで、病理学的にも肺線維化を抑制することが示唆された。

IPF は確定診断後の平均余命が約 3.5 年という難治性疾患であるが、根本的な治療法はいまだに開発されていない。近年、日本において IPF 患者における抗線維化薬としてピルフェニドンが承認許可されている。ピルフェニドンの作用機序としては、TNF- α などの炎症性サイトカイン産生抑制や線維芽細胞のコラーゲン産生抑制効果などが報告されており (Nakazato H, et al. European journal of pharmacology. 2002;446:177-85.)、また第 III 相臨床試験の結果、肺機能低下の抑制を示すことが報告された (King TE, et al. A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. The New England journal of medicine. 2014.)。また Nintedanib (BIBF1120) は VEGFR, FGFR, PDGFR の 3 つの受容体を標的とするトリプル・チロシンキナーゼ阻害剤であり、これも IPF 患者における抗線維化薬として第 III 相臨床試験により肺機能低下の抑制を示すことが示され (Richeldi L, et al. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. The New England journal of medicine. 2014.)、日本においても承認許可がなされた。このように、現在、抗線維化薬の開発および臨床導入が精力的に行われているものの、依然として IPF 患者の予後は厳しい状況である。

本研究で、我々は *in vitro* においてヒト肺胞上皮細胞である A549 に EMT を誘導する cell-based assay システムを用いて、既存薬や新規化合物を含む薬剤ライブラリーの中から非常に強い EMT 抑制効果を有する薬剤を

同定した。様々な議論があるものの、肺線維症の病態における EMT の関与については基礎的および臨床検体を用いた論文が数多く報告されており、EMT 阻害剤、とくに肺胞上皮細胞における TGF- β 誘導性 EMT を阻害する薬剤の開発は現在極めて予後不良疾患である IPF 患者の予後改善に有効である可能性がある。

本薬剤は、ヒト肺胞上皮である A549 細胞における TGF- β 誘導性 EMT を著明に抑制し、Fibronectin の産生増加、TGF- β 誘導性 Smad2 のリン酸化も有意に抑制した。また *In vivo* 肺線維症マウスモデルにおいても病理学的に肺線維化を有意に抑制し、肺組織における Collagen や Fibronectin の産生および Smad2 のリン酸化も抑制した。これらの結果は、EMT を標的とした阻害剤は新規 IPF 治療薬になりうることを強く示唆している。

新規治療薬の臨床導入のためには、標的因子がしっかり同定されていること、また治療効果を予測するバイオマーカーの探索が極めて重要である。本研究において、我々は機能性ナノ磁性微粒子 (FG ビーズ) も用いて、本候補薬剤の標的因子・蛋白の同定・解析も試みた。ビーズ固定化した薬剤と TGF- β によって EMT を誘導した A549 細胞および Control 細胞のタンパク抽出液を混合し、結合反応、磁気分離、洗浄、標的蛋白の溶出を行った。そして SDS-PAGE を施行し、Transfer した membrane で個別に特異的抗体で Western blot を施行し、薬剤とあるタンパク質が結合することを確認した。これらのデータは、本薬剤の直接的な標的蛋白を同定している可能性を強く示唆しており、現在、siRNA による knockout により EMT における関与を検証中である。

我々は、同時に IPF 患者の肺線維化病巣組織検体を収集し、免疫組織染色などで EMT マーカー (E-cadherin, Fibronectin, Vimentin など) や関連因子 (Smad2, ZEB1 など) の発現解析も行っている。そして高度な肺線維化を呈する IPF 患者の肺組織においては、これらの因子が高発現していることも確認している。今後は、上記薬剤の臨床応用を念頭におき、標的蛋白の候補であるタンパク質の免疫染色も施行して、薬剤の実地診療でのバイオマーカーとしての意義も検証する予定である。

本研究は、有効な治療法が未だ確立されていない IPF におけるアンメット・メディカル・ニーズである新規治療薬の開発である。医療現場においては、いまだに副腎皮質ステロイド剤と免疫抑制剤が使用されている症例も多く、EMT を標的とした治療法は IPF の病態により則していると考えられる。これらは副作用が軽減される可能性があるだけでなく、治療成績の向上や予後改善にも寄与することが期待でき、また IPF の病態・機序の解明の一助になると考える。

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 5 件)

1. Tajima K, Yae T, Javaid S, Tam O, Comaills V, Wittner B, Morris R, Liu M, Engstrom A, **Takahashi F**, Black J, Ramaswamy S, Shioda T, Hammell M, Haber DA, Whetstine JR, Maheswaran S. SETD1A modulates cell cycle progression through a miRNA network that regulates p53 target genes. *Nature Commun* 23;6:8257. (2015) doi: 10.1038/ncomms9257. 査読有り
2. Kobayashi I, **Takahashi F**, Nurwydia F, Nara T, Hashimoto M, Murakami A, Yagishita S, Tajima K, Hidayat M, Shimada N, Suina K, Yoshioka Y, Sasaki S, Moriyama M, Moriyama H, **Takahashi K**. Oct4 plays a crucial role in the maintenance of gefitinib-resistant lung cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 22;473:125-32.(2016) doi:10.1016/j.bbrc.2016.03.064. 査読有り
3. Hoshika Y, **Takahashi F**, Togo S, Hashimoto M, Takeshi N, Kobayashi T, Nurwidya F, Kataoka H, Kurihara M, Kobayashi E, Ebana H, Kikkawa M, Ando K, Nishino K, Hino O, **Takahashi K**, Seyama K. Haploinsufficiency of the folliculin gene leads to impaired functions of lung fibroblasts in patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Physiological Reports* 4(21). pii: e13025. (2016) 査読有り
4. Kohsaka S, Nagano M, Ueno T, Suehara Y, Hayashi T, Shimada N, **Takahashi K**, Suzuki K, Takamochi K, **Takahashi F**, Mano H. A method of high-throughput functional evaluation of EGFR gene variants of unknown significance in cancer. *Science Transl Med* 15;9(416). (2017) doi:10.1126/scitranslmed.aan6566. 査読有り
5. Takamochi K, **Takahashi F**, Suehara Y, Kitano S, Sato E, Kohsaka S, Hayashi T, Mano H, Suzuki K. DNA mismatch repair deficiency in surgically resected lung adenocarcinoma: Microsatellite instability analysis using the Promega panel Lung Cancer. *Lung Cancer* 110:26-31. (2017) doi:10.1016/j.lungcan.2017.05.016. 査読有り

(学会発表)(計 2 件)

1. Kato M, **Takahashi F**, Ihara H, Sato T, Tajima K, Baskoro H, Hidayat M, Wirawan A, Takeda I, Hayakawa D, Koinuma Y, Suina K, Kanemaru R, Shimada N, Sasaki S, **Takahashi K**. Bleomycin Induced Epithelial Mesenchymal Transition in Mice. Congress of American Thoracic Society 2017 Washington, DC
2. Hidayat M, **Takahashi F**, Tajima K, Nurwidya F, Wirawan A, Kanemaru R, Koinuma Y, Hayakawa D, Tajima

M, Matsumoto N, Kanamori, K,
Takeda I, Kato M, Kobayashi I,
Shimada N, **Takahashi K**. Role of
quiescent cancer stem cells in the
gefitinib resistance in EGFR
mutation positive non-small cell lung
cancer. Congress of the Asian Pacific
Society of Respiriology (APSR)
2017 Sydney

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 史行 (TAKAHASHI, Fumiyuki)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：70327823

(2)研究分担者

高橋 和久 (TAKAHASHI, Kazuhisa)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：80245711

(3)連携研究者

佐谷 秀行 (SAYA, Hideyuki)
慶応大学・医学部・教授
研究者番号：80264282