

令和元年6月13日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09223

研究課題名(和文) 間質性肺疾患に対する革新的分子標的治療法の確立

研究課題名(英文) Development of innovative molecular targeted therapies for interstitial lung disease

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)・客員研究員

研究者番号：90570953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺線維症は根治治療が存在しない難病であり、新規治療薬開発が急務である。本研究者は、コラーゲン合成に必要な蛋白質であるheat shock protein (HSP) 47が、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ことを示した。本研究は、(1)HSP47に対するsiRNAを用いた直接的なHSP47発現抑制、(2)HSP47 inhibitorを用いたHSP47シャペロン機能の抑制、という2つの異なるアプローチを用い、“HSP47をターゲットとした分子標的治療”という新しい観点から線維化を抑制する治療法を創出することを目的として行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、(1)HSP47に対するsiRNAを用いた直接的なHSP47発現抑制、(2)HSP47 inhibitorを用いたHSP47シャペロン機能の抑制、という2つの異なるアプローチを用い、線維化を抑制する治療法を創出することを目的とした。学術的独自性および創造性は、分子標的薬剤を使用してHSP47発現を制御することにより、特発性肺線維症における生体応答のベクトルを「促線維化」から「抗線維化」へと変換させる治療法を開発することである。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis is an incurable disease for which there is no curative treatment, and the development of new therapeutic agents is urgently needed. The present investigators have shown that heat shock protein (HSP) 47, which is an essential protein for collagen synthesis, promotes fibrotic progression and causes negative physiological actions in various fibrotic diseases. We used two different approaches: direct inhibition of HSP47 expression using siRNA for HSP47, and inhibition of HSP47 chaperone function using HSP47 inhibitor.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：間質性肺疾患 HSP47

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は不可逆的な肺線維化をきたす進行性難治性疾患である。本邦だけでも 1 万人以上の IPF 患者がいるが、根本的治療法はなく、診断後の平均生存期間は 3 年程度と予後は極めて不良である。そのため、IPF の根治治療を可能にする新規治療薬の開発は喫緊の課題である。この問題を解決すべく本研究課題では、IPF の新規治療ターゲットおよび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研究を行った。

HSP47 はコラーゲン特異的分子シャペロンであり、コラーゲン合成に必要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。本研究者はこれまでに、HSP47 が肺線維症モデルマウスにおいて線維化の進行と比例して発現が上昇することを見出した。また、ヒトの間質性肺炎においても、1)HSP47 は線維化病変局所において特異的に強く発現する、2)間質性肺疾患の病理分類ごとに HSP47 発現量が異なる、3)その発現量は間質性肺疾患の予後予測因子であることなどを明らかにしてきた。

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することができる。IPF では、活性化した線維芽細胞からコラーゲンが大量に産生され、間質に膠原線維が沈着することにより不可逆的な線維化が進行していくことが知られている。従って、HSP47 はこれまで有効な治療法がなかった IPF の新たな分子標的治療のターゲットになると考えられる。本研究では“HSP47 をターゲットとした分子標的治療”という新しい観点から、肺線維症の根本的治療法開発を目指した。

近年、siRNA などの核酸医薬が次世代の治療薬として注目され開発が進んでいる。核酸医薬は従来の低分子医薬品やバイオ医薬品では標的にできなかった分子を標的にすることが可能であり、規格化・品質管理が容易で特異性及び効果が高い。そのため、HSP47 に対する siRNA 医薬は IPF に対する新たな治療手段として有用であると思われる。

また、Ananthanarayanan 教授 (McMaster University) らは化合物ライブラリーのスクリーニングにより、HSP47 のシャペロン機能を抑制する化合物 (HSP47 inhibitor) (Christy A. et al. J. Med. Chem. 2005) を見いだした。この HSP47 inhibitor も IPF の新たな治療薬候補として注目されている。

しかし、siRNA などの核酸医薬は細胞内への取り込みに乏しく、生体内で速やかに分解されるため、これまで実用化が困難であった。また、HSP47 inhibitor に関しては臓器移行性の問題がある。本研究では、本研究協力者 (佐々木、長崎大学病院薬剤部教授) らが開発した画期的 drug delivery system (DDS) (Kurosaki et al. Mol Pharm 2011) を用いることにより、この問題の解決を目指した。これは生体適合性の高い成分を静電的に自己組織化させ、臓器特異的に薬物取り込みや遺伝子発現できる画期的なナノ DDS 製剤である。本研究で用いる肺指向性ナノボールをマウスへ静脈内投与すると、肺における遺伝子発現は市販のベクターと比較して約 160 倍高く、単回投与で肺において 6 週間もの長期間遺伝子発現が持続することが示されている。更に本ナノボールは製剤表面がアニオン性に帯電しているため、従来のベクターに比べ細胞毒性および血液毒性が大幅に軽減できる。更に、ナノ DDS 製剤は医薬品に使用されている既知成分により構築しているため、生体適合性及び安全性が極めて高く、迅速な臨床応用が期待できる。

また、近年癌の転移や治療耐性のメカニズムの原因の一つとして上皮間葉移行 (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition) が注目されている。抗線維化薬である Pirfenidon が EMT を抑制するといった報告があり、線維化のマーカー、治療ターゲットとして注目されている。HSP47 においても、EMT を介して癌の転移や治療耐性との関連が疑われている。実際に、大腸癌において、癌間質における HSP47 陽性 spindle cell 発現数がその後の遠隔転移のリスク因子であるといった報告がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、(1)HSP47 に対する siRNA を用いた直接的な HSP47 発現抑制、(2)HSP47 inhibitor を用いた HSP47 シャペロン機能の抑制、という 2 つの異なるアプローチを用い、線維化を抑制する治療法を創出することを目的として研究を行った。また、肺癌組織での癌間質における HSP47 発現を検討することにより、癌間質の線維化とそこにおける HSP47 発現を検討し、癌間質の線維化や癌転移のメカニズムの解明を行うことを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

マウス肺線維芽細胞、ヒト肺線維芽細胞、ヒト肺胞上皮由来細胞を用いて、ナノ DDS 製剤を用いた HSP47 siRNA および HSP47 inhibitor の細胞取り込み、HSP47 遺伝子発現抑制効果、I 型コラーゲン蛋白産生抑制効果を検討した。また、*in vitro* における肺指向性遺伝子ベクターを用いた HSP47 siRNA の線維化抑制効果を確認した。また、当院

における1年間の肺癌手術標本を用い、HSP47免疫染色を行い、HSP47発現程度と予後や転移などとの関連を後方視的に解析した。

具体的には下記のように検討を行った。

- (1) TGF- $\beta$  刺激を加えたヒト正常肺線維芽細胞を用いて、HSP47 inhibitor 投与によるHSP47蛋白質、I型コラーゲン産生への影響をRT-PCR、Western blotを用いて検討した。
- (2) プレオマイシン肺線維症モデルにHSP47 inhibitorを投与し *in vivo* での抗線維化効果を検討した。
- (3) ヒト正常肺線維芽細胞およびマウス肺線維芽細胞に対して、肺指向性遺伝子ベクターによってHSP47 siRNA transfectionを行い、HSP47蛋白質、I型コラーゲン産生への影響をRT-PCR、Western blotを用いて検討した。
- (4) 期間内に肺癌切除術を施行され、その後の臨床経過を追うことができた77例に対し、手術標本を用いて、HSP47免疫染色を施行した。肺癌組織におけるHSP47発現を発現の強さと発現割合をスコア化し、その乗算を用いて予後や無増悪生存期間などの臨床経過を高発現群、低発現群で比較した。癌間質におけるHSP47 spindle cell 数を0.15mm<sup>2</sup>(対物レンズ40倍 3視野相当)の範囲で測定し、同様に検討を行った。

#### 4. 研究成果

- (1) 正常ヒト成人肺線維芽細胞を用いて、TGF- $\beta$  1およびHSP47 inhibitorによる、HSP47とI型コラーゲン遺伝子発現およびタンパク質産生量に対する効果を解析した。その結果、TGF- $\beta$  1はHSP47およびI型コラーゲン遺伝子の発現を顕著に促進すること、そして、HSP47 inhibitorはHSP47およびI型コラーゲン遺伝子発現を顕著に抑制することが示された。さらに、タンパク質レベルでも、TGF- $\beta$  1はHSP47およびI型コラーゲンタンパク質の産生を促進し、HSP47 inhibitorは顕著に抑制することが示された。
- (2) プレオマイシン肺線維症モデルにHSP47 inhibitorを投与し *in vivo* での抗線維化効果を検討した。マウスの生存率を改善させ、体重減少も抑制する傾向が認められた。
- (3) ヒト正常肺線維芽細胞において、HSP47 siRNAによりHSP47蛋白質の knock downを行うことで、I型コラーゲン蛋白質の発現が抑制される事が示された。また、マウス肺線維芽細胞に対して、肺指向性遺伝子ベクターによってHSP47 siRNA transfectionを行い、HSP47 mRNAをRT-PCRを用いて測定し、その knock down 効率を Lipofectamin による transfection と遜色ない事を確認した。今後は同様に肺指向性遺伝子ベクターによるHSP47 siRNA transfection がHSP47蛋白質、I型コラーゲン蛋白質の発現に与える影響をWBにより確認し、同時にその viability を MTT assay を用いて確認する方針である。
- (4) 肺癌手術検体において、肺癌組織におけるHSP47発現は、adenocarcinoma では、他の組織型と比較し高発現であった。しかし、その生存期間、無増悪生存期間、TNM分類における各因子において、HSP47高発現群と低発現群に有意差はなかった。癌間質におけるHSP47陽性 spindle cell は adenocarcinoma の症例と比較し、他の肺がんの組織型において、より高発現していた。また、病理組織における所属リンパ節への転移がある群において、より高発現していた。生存期間、無増悪生存期間においては、高発現群と低発現群において有意差はなかったが、今後さらに症例を追加し検討を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 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 1 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)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：小畑 陽子  
ローマ字氏名：OBATA, Yoko

研究協力者氏名：原田 達彦  
ローマ字氏名：HARADA, Tatsuhiko

研究協力者氏名：由良 博一  
ローマ字氏名：YURA, Hirokazu

研究協力者氏名：朝長 正臣  
ローマ字氏名：TOMONAGA, Masaomi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。