

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09227

研究課題名(和文) 進行性肺線維症の早期鑑別診断と治療効果判定のための末梢血中循環miRNAの評価

研究課題名(英文) Evaluation of circulating miRNAs in the patents with intractable progressive fibrosis of the lung, for the effective differential diagnosis and therapeutic strategy.

研究代表者

海老名 雅仁 (EBINA, Masahito)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：10280885

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)：効果的な治療法が限られている特発性肺線維症いまだに保険適用となる治療薬が承認されていない線維性特異性間質性肺炎、およびいわゆる上肺野優位型肺線維症はいまだに難治性進行性肺線維症のまま、呼吸器臨床上大きな問題となっている。これらの患者に対する抗肺線維化作用を持つニンテダニブとピルフェニドン、および免疫抑制作用を併せ持つタクロリムスやプレドニンの服用前後の患者血清中のmiRNAを網羅的に測定した。これらの結果はさらにその臨床上の変化、および以前測定したマウス・ブレオマイシン肺の線維化過程における循環miRNAと肺組織内のmiRNAの変化とも比較することによってより効果的な治療戦略の糸口を形成した。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), fibrotic non-specific interstitial pneumonia (f-NSIP), and pulmonary parenchymal fibro-elastosis (PPFE) are notorious progressive diseases of pulmonary fibrosis, because of their high intractability. To find out and construct effective treatment strategy against these progressive fibrosis of the lung, we measured and analyzed the circulating miRNA of the patients before and after treatment with medication by anti-pulmonary fibrosis, Nintedanib, Pirfenidone, Tacrolimus, and/or Steroids. These results were compared with our previous results of alteration of circulating miRNAs in the animal models, bleomycin-induced lung fibrosis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺線維症 循環miRNAs IPF f-NSIP PPFE 難治性 治療戦略

1. 研究開始当初の背景

1) 進行性肺線維症の問題点:

原因が特定しえない難治性肺線維症としては従来、特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)と線維性非特異性間質性肺炎 (fibrotic non-specific interstitial pneumonia, f-NSIP) がよく知られていたが、さらに最近では胸膜直下の肺の線維化が亢進する肺胸膜弾性線維症 (pleuro-parenchymal fibroelastosis, PPFE)が、その臨床上難治性が際立つことが大きな問題になっている (AJRCCM, 2013)。IPF に関して申請者は国内外のガイドライン策定にも携わり (AJRCCM, 2011)、Pirfenidone (ERJ, 2010) や Nintedanib (BIBF 1120) (NEJM, 2014) および班研究としてのサイクロスポリン (CsA) 療法やムコフィリン (NAC) 吸入療法の医師主導治験も通して理解を深めてきたが、IPF の治療抵抗性の肺線維化病態の対策はいまだに困難であるのが実情である。他 2 疾患には診断や治療の指針も確立されておらず、今後はその早期診断と治療効果の過程を示しうる末梢血中のバイオマーカーの確立が求められている。

2) 間質性肺炎マーカーの問題点:

現在間質性肺炎の血清マーカーとしては、おもに Ⅱ型肺胞上皮細胞から産生されるサーファクタント蛋白 D (SP-D) と KL-6 が知られ、間質性肺炎に際しては肺胞上皮細胞障害後に再生してくる Ⅱ型肺胞上皮細胞がこれらの蛋白の産生を高め、末梢血中のこれらの蛋白濃度が間質性肺炎の病態とよく相関することが知られてきた (AJRCCM, 2011)。しかしこれらの蛋白はいずれも Ⅱ型肺胞上皮細胞から産生され、かならずしも線維化の過程を直接的に示すものではないことがしばしば臨床上で問題となる。現に、1992 年に国内で上葉限局型肺線維症 (網谷病) と発表された疾患や 1999 年に上葉優位型肺線維症

などによばれていた疾患が、近年 PPFE と総称されて臨床概念が再認識始めているが、間質性肺炎マーカーである SP-D や KL-6 の上昇をみないこと症例が多いことが特徴としても理解されつつある。

3) 循環 miRNA:

末梢血液中の循環 miRNA に関しては、当初その不安定性が懸念されたが、径 100nm 以下のエクソゾーム内では血液中でもホルマリン組織内でも長い時間安定して存在することが明らかになった。その検出技術向上にともなって、担癌患者の末梢血中の循環 miRNA の解析が国内で先行して詳細なデータが集約され、癌の早期発見の可能性が話題を集めている (右図, Cancer Science, 2010)。細胞から放出されたエクソゾーム内の miRNA は早期診断に役立つばかりでなく、様々な免疫細胞や血管内皮細胞、線維芽細胞などに作用してサイトカインやケモカイン産生を制御していることが示されていることから、将来的には治療への応用も期待されている。しかし IPF を含めて進行性肺線維症に関する末梢血中循環 miRNA に関する報告はまだほとんどないのが実情である。

2. 研究の目的

「進行性肺線維症の早期鑑別診断と治療効果判定のための末梢血中循環 miRNA の評価」は、申請者がこれまでに行ったブレオマイシンマウス肺線維症モデルの末梢血中循環 miRNA の解析結果に基づき、特発性肺線維症 (IPF)、線維性非特異性肺線維症 (f-NSIP) および肺胸膜弾性線維症 (PPFE) の 3 疾患からなる進行性肺線維症患者の治療前および治療後の変化の解析を通して、(1) 進行性肺線維症における末梢血中循環 miRNA が 3 疾患の鑑別を可能にするか、および (2) 進行性肺線維症の治療効果判定の新たなバイオマーカーとしての可能性に関して検討する

ことを目的にしている。将来的にはこれらの miRNA が循環線維細胞や炎症細胞などに対する機能の理解に伴い、治療への応用の可能性も考慮する

3. 研究の方法

- (1) 申請者の所属する東北薬科大学病院内の倫理委員会に介入を伴わない臨床研究として申請し、インフォームドコンセントを含む研究計画書の承認を受ける。
- (2) 現在行っている「間質性肺炎新患外来」などを通して呼吸器内科外来に初回受診となった患者を対象として、胸部HRCT画像所見、呼吸機能検査、血液検査などによる診断を介して、現時点における確かな鑑別診断を行う。特に原因が特定しえない特発性であること、進行性肺線維症であることを確認する。
- (3) 対象患者に当該臨床研究に関する十分な説明と理解を得るように努め、インフォームドコンセントを得て、静脈血を採取し、-80℃で凍結保存する。
- (4) すでに臨床検体でも信頼を得た実績を上げ、申請者もこれまでにマウスモデルを用いた解析をしてきた miRNA Oligo chip 3D-Gene (TORAY)を用いた解析を行う。
- (5) 初年度には対象患者とその検体の保存を中心とし、まず治療開始前の血液検体の的確な保存を行う。保存は所属施設の検査部にある機器と冷凍庫を用いる。
- (6) 初診時の進行性肺線維症患者の血液検体に関しては初年度にまず症例数が多いことが期待されるIPFとf-NSIPの複数症例を用いて比較検討を行う。
- (7) 当該研究の第一の目標であるところの進行性肺線維症の鑑別診断のバイオマーカーとしての血中循環 miRNA の評価を行う。
- (8) 治療に関しては、現状の臨床において進

行性肺線維症の対象患者に対するもっとも適切と考える治療法を、患者およびその家族の理解を得たうえで通常行っているように選択する。具体的には現行の進行性肺線維症に対する治療としての、少量経口ステロイド療法、ピルフェニドン(PFD) +/- ムコフィリン(NAC)吸入療法、サイクロスポリン(CsA)あるいはタクロリムス(FK)等があげられる。

- (9) 初診時に当該臨床研究に同意して血液検体の許可をいただいた進行性肺線維症患者に対する治療を開始して6か月および1年後に血液検体を収集し、冷凍保存する。
- (10) この間の臨床データは進行性肺線維症に対する通常行っているように執り行う。
- (11) 治療後6か月および1年後の進行性肺線維症の治療効果を判定する。この判定基準はIPFのみある程度規範はあるが、その判定基準をもとにして他のf-NSIP、PPFEへの治療効果を判定する。
- (12) 治療後の冷凍保存検体の循環 miRNA を解析し、治療前のものと比較する。
- (13) 治療前後の循環 miRNA の解析結果を比較するなかから当該研究の第二の目的である治療効果判定のためのバイオマーカーとして循環 miRNA の評価を行う。
- (14) 可能であれば投与薬剤との比較も検討を加える。
- (15) 得られた包括的なデータ解析から、循環 miRNA の機能標的の可能性を考察する。

4. 研究成果

特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF), 線維性非特異性間質性肺炎 (fibrotic non-specific interstitial pneumonia, f-NSIP), および、わが国ではいわゆる上肺野優位型肺線維症として診断されてきた新しい疾患概念であるpleuro-parenchymal fibroelastosis, PPFE)に関

して、現在の時点で抗肺線維化作用の効果が示されているピルフェニドン、ニンテダニブ、およびタクロリムスの服薬前後の患者血清中のmiRNA(circulating miRNA, 循環miRNA)を、当該臨床施設の倫理委員会の承認を得たインフォームド・コンセントの書式に同意をいただいた患者を限定したうえで、網羅的に測定し、その臨床的な効果と比較することによって、まだ知られていない実際の薬剤効果の検証を試みた。

実際の測定された患者血清は22検体、10名の進行性肺線維症患者である。疾患としては臨床的な偏りもあってIPFが70%。fNSIP様からIPFに特徴的な病変に変化した2名、どちらかというPPFEに近い進行性肺線維症が1名であった。初診時と薬剤服薬後の変化を見ることができたのはニンテダニブが6名、ピルフェニドンが1名で70%を占める。

得られた膨大な量データを、臨床データと詳細に検討を進めている。さらに以前肺線維症の動物モデルであるマウスにブレオマイシンを投与した肺線維症発症経過の血中miRNAのデータとつぎ合わせて解析をすすめる。

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1件)

1. Ebina M.

Pathognomonic remodeling of blood and lymphatic capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis Respir Investig.2017 55:2-9.

[学会発表](計1件)

1 . Ebina M.

“ Basic mechanisms of exacerbations of IPF in association with AIP ”

In the Symposium “ Exacerbations and

potential therapies of IPF ” on November the 24th in APSR 2017 in Sydney, Australia.

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

海老名雅仁 (Ebina Masahito)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号 : 10280885