

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17183

研究課題名（和文）第2世代抗線維化チロシンキナーゼ阻害薬TAS-115の機能解析から臨床への展開

研究課題名（英文）Functional Analysis of TAS-115, a Second Generation Antifibrotic Tyrosine Kinase Inhibitor, and its Clinical Application

研究代表者

小山 亨也（KOYAMA, Kazuya）

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：90724089

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：新規抗線維化薬であるTAS-115のシリカ誘発性肺線維症マウスモデルにおけるマクロファージへの作用とそこからもたらされる抗線維化効果に注目し検討を行った。TAS-115はシリカ誘発性肺線維症モデルにおいてprofibrotic geneが高発現であるCD11b+CD11c+マクロファージ分画の増加を抑制した。しかし、TAS-115投与はシリカモデルにおいて統計学的有意でないものの肺線維化の増悪傾向をきたした。これらのことから線維症モデルにより線維化の機序が異なること、病態によってはprofibrotic macrophageの機能抑制が線維化増悪につながる可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TAS-115は第 相試験にてニンテダニブを含む既存の抗線維化薬治療下で肺線維化進行例において有効性を示した。そのため本検討はTAS-115のニンテダニブよりも強いlc-FMSリン酸化抑制作用に着目しシリカ肺線維症モデルにおけるマクロファージ活性抑制からその抗線維化作用を検討した。TAS-115はシリカ誘発性肺線維症モデルにおいて線維化に関連すると考えられるマクロファージの増加を抑制したが、肺線維症を改善しなかった。このことから肺の線維化が病態により多彩な機序を有していること、必ずしも線維化に関わるマクロファージの抑制が病的な線維化につながるわけではないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the effect of new anti-fibrotic drug, TAS-115, in silica induced pulmonary fibrosis murine model, particularly focusing on its suppressive effect on profibrotic macrophages. Administration of TAS-115 decreased the number of CD11b+CD11c+ macrophages expressing profibrotic genes in silica induced pulmonary fibrosis murine model unlike nintedanib. However, TAS-115 treatment resulted in worsening of pulmonary fibrosis, although this was not statistically significant. These findings suggest that the mechanism of fibrosis differs in different fibrosis murine models and that inhibition of profibrotic macrophage function may lead to worsened fibrosis in some pathological conditions.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺線維症 マクロファージ TAS-115 ニンテダニブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は慢性進行性の肺線維化をきたす疾患であり、平均予後は 3-5 年と報告されている予後不良な疾患であり、その治療開発は急務である。現在、抗線維化薬としてピルフェニドンとニンテダニブが上市されているが、副作用の軽減や IPF の予後改善、急性増悪の予防の向上にはさらなる新薬開発の余地がある。そのためには IPF の病態をさらに解明することが求められるとともに、現在有効性が指摘されている薬剤の作用機序を改めて再検討することも有用であると考えられる。

2. 研究の目的

我々は新規チロシンキナーゼ阻害薬 TAS-115 のマウス肺線維化モデルでの有効性を指摘し (Am J Respir Cell Mol Biol. 2019 Apr;60(4):478-487.), 第 II 相臨床試験において既存の抗線維化薬不応例において有効性がみられることを報告した。過去に我々は TAS-115 と同様のチロシンキナーゼ阻害薬であるニンテダニブと比較して TAS-115 において c-FMS の抑制効果がありマクロファージの機能抑制により肺線維化を改善する可能性を指摘した。本研究では TAS-115 の c-FMS 抑制効果に注目し既存治療の治療標的と異なる TAS-115 の抗線維化作用の検討を行い、最終的には臨床試験を介して既存の抗線維化薬不応例への後続治療や併用療法の臨床試験に結び付け、IPF 治療の向上を目指すものとする。

3. 研究の方法

・シリカ誘発性肺線維症マウスモデルの作成

シリカを 400mg/kg を 8 週齢 C57/BL6 オスマウスに単回経気管内投与し肺線維症マウスモデルを作成した。TAS-115 は 100mg/kg/day、ニンテダニブは 60mg/kg/day を Day14 から連日経口投与した。

・マウス肺の線維化の評価

マウス肺を摘出し、組織学的な線維化スコアによる評価及び hydroxyproline 含有量の評価により線維化を評価した。組織学的な評価は摘出した肺をホルマリン固定し、パラフィン包埋した後、スライドを作成し HE 染色及び Azan 染色を行い組織学的に Ashcroft スコアを用いて線維化を評価した。また肺を凍結保存し組織中の hydroxyproline 量を hydroxyproline assay kit (BioVision, Mount View, CA, USA) を用いて測定した。

・フローサイトメトリー

シリカ投与後のマウス肺から単細胞浮遊液を作成し CD45⁺ cells isolation kit (Miltenyi Biotec K.K., Bergisch Gladbach, Germany) を用いて AutoMACS (Miltenyi Biotec K.K., Bergisch Gladbach, Germany) で血球を採取し、その後、FACSVerse (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。CD45⁺CD64⁺細胞をマクロファージとした。

・セルソーター

シリカ投与後のマウス肺から単細胞浮遊液を作成し CD45⁺ cells isolation kit (Miltenyi Biotec K.K., Bergisch Gladbach, Germany) を用いて AutoMACS (Miltenyi Biotec K.K., Bergisch Gladbach, Germany) で血球を採取し、Cell sorter (Sony Biotechnology Inc, San Jose, CA) を用いてソーティングを行った。

・qPCR

Cell sorter (LE-SH800) を用いて回収したマクロファージから RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて RNA を回収し High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) で cDNA を作成した後、qPCR を行った。mRNA 発現レベルは GAPDH にて補正を行った。

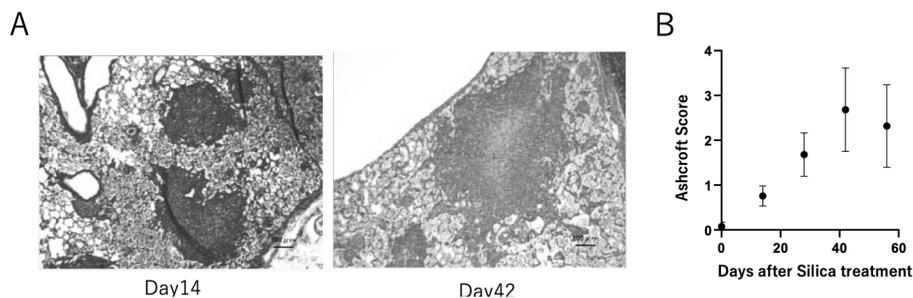


図 1. シリカ誘発性肺線維症マウスモデル. (A) シリカを気管内投与後 Day14 及び Day42 の肺組織所見. (B) シリカ気管内投与後の肺線維化の推移.

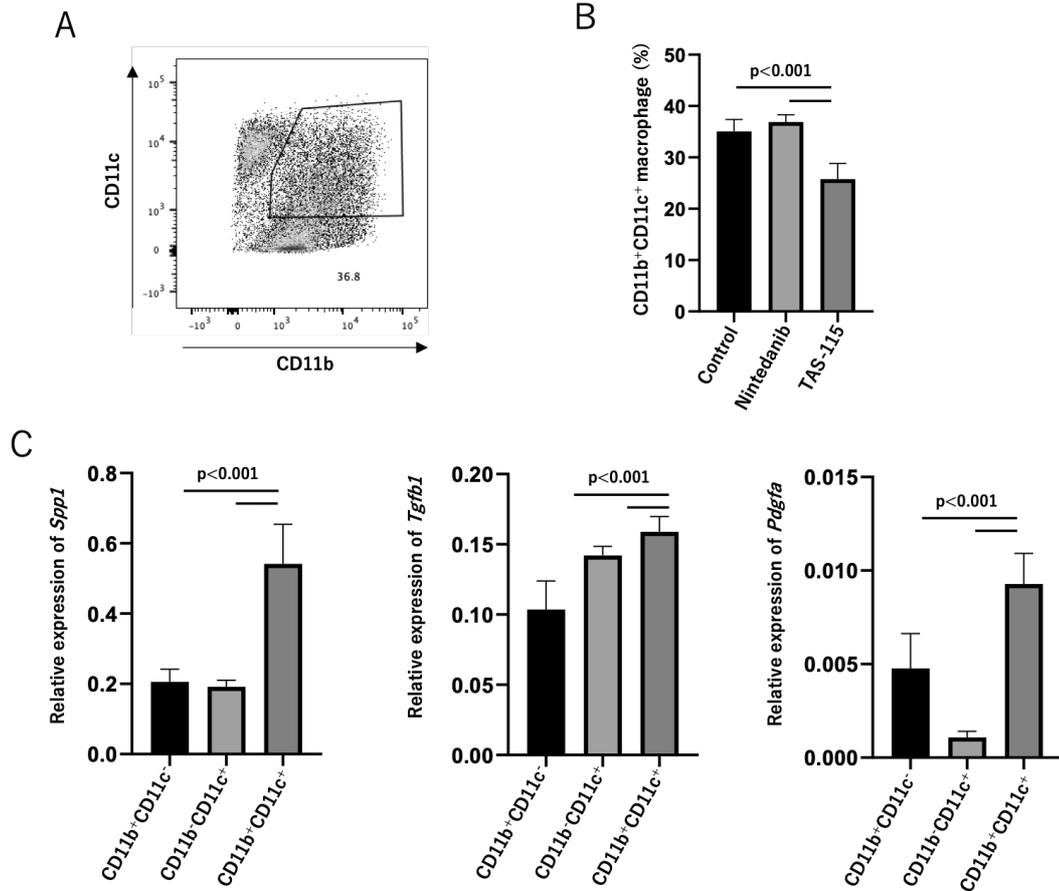


図2. シリカ誘発性肺線維症マウスモデルにおける肺内マクロファージ. (A) シリカを気管内投与後 CD11b⁺CD11c⁺マクロファージ分画の割合が増加する. (B) ニンテダニブまたは TAS-115 経口投与によるシリカ気管内投与後 Day28 における CD11b⁺CD11c⁺マクロファージ分画の割合の変化. ニンテダニブまたは TAS-115 は Day14 より連日投与した. (C) シリカ気管内投与後 Day28 における肺内マクロファージの profibrotic gene の mRNA 発現レベル.

4. 研究成果

・シリカ気管内投与による肺線維症誘発 (図1)

マウスにシリカを気管内投与しシリカ誘発性肺線維症モデルを作成した。Day14 以降に肉芽種の中心に線維化病変の形成が見られ経時的に線維化は増悪した。

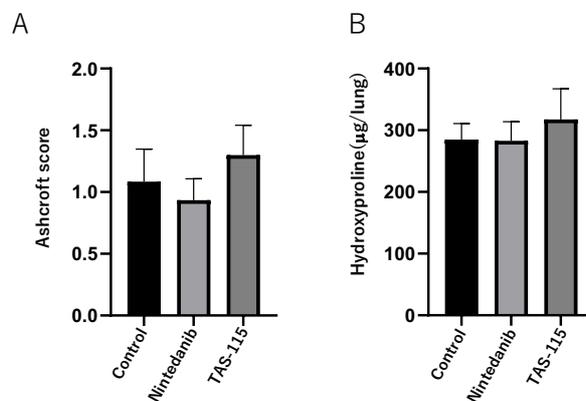


図3. TAS-115 及びニンテダニブのシリカ誘発性肺線維症に対する効果. (A) Ashcroft score. (B) Hydroxyproline 含有量. いずれもシリカ気管内投与後 Day28 に摘出したマウス肺で評価した. TAS-115 及びニンテダニブはシリカ気管内投与後 Day14 より連日投与した.

- ・シリカ気管内投与によるマクロファージの変化 (図2)

シリカ気管内投与後 Day28 においてマクロファージ内で CD11b⁺CD11c⁺マクロファージの割合が増加した(図2A)。この分画の増加は TAS-115 の投与により抑制された(図2B)。CD11b⁺CD11c⁺マクロファージの性質を調べるため *Spp1*, *Tgfb1*, *Pdgfa* について qPCR を実施した。CD11b⁺CD11c⁺マクロファージは CD11b⁺CD11c⁻マクロファージ、CD11b⁻CD11c⁺マクロファージと比較して *Spp1*, *Tgfb1*, *Pdgfa* の発現が高かった(図2C)。これらのことから CD11b⁺CD11c⁺マクロファージは profibrotic macrophage である可能性があること、TAS-115 は profibrotic macrophage の増加を抑制することが示唆された。既報告で profibrotic macrophage への分化に M-CSF シグナルの必要性が指摘されており、TAS-115 による c-FMS 抑制が CD11b⁺CD11c⁺マクロファージ減少につながった可能性が考慮された。

- ・シリカ気管内投与によるマクロファージの変化 (図3)

シリカ誘発性肺線維症マウスモデルにおける TAS-115 及びニンテダニブの効果を検討した。シリカ気管内投与後、TAS-115 (100mg/kg/day) もしくはニンテダニブ (60mg/kg/day) を連日経口内服させ Day28 に肺を摘出し、線維化を評価した。有意差はなかったものの、TAS-115 内服群では線維化の増悪傾向が見られた(図3A, B)。

- ・考察

本検討では TAS-115 がニンテダニブより強い c-FMS 抑制作用を持っていることに注目し、肺線維症への有効性を特にマクロファージが線維化に寄与しているモデルであるシリカ誘発性肺線維症マウスモデルにおいて検討した。TAS-115 投与は profibrotic macrophage と考えられる CD11b⁺CD11c⁺マクロファージの割合を減少させたが線維化の改善は認めなかった。

肺線維症の病態にマクロファージが関与している可能性については示唆されてきたが、その寄与の実態については不明な点が多い。Johi らはマウス肺線維症モデルにおいて線維芽細胞活性化作用を有する PDGF 発現の高い profibrotic macrophage の維持に M-CSF が必要であることを示した(Eur Respir J. 2020;55:1900646.)。このことから c-FMS の阻害は profibrotic macrophage の数を減少させる可能性があり、その作用はニンテダニブよりも TAS-115 で強いことが考慮された。実際に本検討ではシリカ肺におけるマクロファージで *Pdgfa* 発現が高かった CD11b⁺CD11c⁺マクロファージの割合がニンテダニブ投与では減少せず、TAS-115 では減少が見られた。このことは TAS-115 の方がニンテダニブよりも線維肺においてマクロファージに影響を強く与えることを示している。

今回の検討で TAS-115 は profibrotic macrophage の抑制効果を示したが、肺線維化の改善を示さなかった。ニンテダニブでは過去にシリカ誘発性肺線維症モデルでは中途からの経口内服が有意な線維化改善をきたさないことが報告されていた(Pharmacol Exp Ther. 2014;349:209-20.)。シリカ誘発性肺線維症モデルがブレオマイシンモデルと比較してマクロファージにより依存した病態で線維化をきたすこと、TAS-115 が c-FMS を抑える効果が強いことから TAS-115 の Day15 からの投与でニンテダニブと異なって線維化抑制が見られることを期待していたが、結果としては統計学的有意差はつかないものの若干増悪傾向であった。このことは Shichino らが指摘している通りシリカ肺線維症モデルにおいてはマクロファージは病変の限局化に関わっており、阻害することは病変拡大につながる可能性が考えられた(Am J Pathol. 2015 Nov;185(11):2923-38.)。異物を封じ込め処理することは本来の合目的的なマクロファージとしての機能と考えられ、profibrotic macrophage を抑制することが必ずしも線維化を改善するわけではなくその生理的な病変の拡大阻止の機能を阻害する可能性が示唆された。

ブレオマイシンモデルで有効であった抗線維化薬であるニンテダニブや TAS-115 がシリカ誘発性肺線維症モデルにおいて有効性が指摘できなかったのは線維化の病態の多彩性を示すものと考えられ、疾患ごとに病態の理解や抗線維化薬の役割を検討する必要があることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------